

Silvana Katia Tischer Seraglio

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
UTILIZANDO LC-ESI-MS/MS, BIOACESSIBILIDADE *IN*
VITRO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DE MEL DE MELATO DE BRACATINGA
(*Mimosa scabrella* Bentham)**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciência dos
Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina
de Oliveira Costa.

Florianópolis
2016

Seraglio, Siluana Katia Tischer

Desenvolvimento e validação analítica para determinação de compostos fenólicos utilizando LC-ESI-MS/MS, bioacessibilidade in vitro de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth) / Siluana Katia Tischer Seraglio ; orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa - Florianópolis, SC, 2016.

137 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth). 3. Digestão in vitro. 4. Compostos fenólicos. 5. Validação analítica. I. Costa, Ana Carolina de Oliveira . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
UTILIZANDO LC-ESI-MS/MS, BIOACESSIBILIDADE *IN
VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DE MEL DE MELATO DE BRACATINGA
(*Mimosa scabrella* Bentham)**

Por

Silvana Katia Tischer Seraglio

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “**Mestrado** em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2016.

Prof. (a). Dr (a). Roseane Fett
Coordenador

Banca examinadora:

Prof.(a). Dr(a). Ana Carolina de Oliveira Costa,
Orientador (UFSC)

Prof.(a). Dr(a). Patricia Faria di Pietro,
Membro (UFSC)

Prof.(a). Dr(a). Edson da Silva,
Membro (UFSC)

Prof.(a). Dr(a). Carmen Maria Oliveira Müller,
Membro (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e força, ao meu pai, minha mãe, meu irmão e irmã que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando de todas as maneiras e em todos os momentos.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela estrutura proporcionada, e igualmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de mestrado concedida. À Professora Dr^a. Ana Carolina de Oliveira Costa por me aceitar como orientada. Pelo voto de confiança dado a mim, pela compreensão, paciência e apoio que foram, sem dúvida, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Agradeço a todas as minhas colegas de Laboratório, que sempre estiveram de prontidão para ajudar em qualquer momento, pela colaboração, apoio e descontração. Assim, como à Professora Roseane Fett e ao Luciano Gonzaga, pelo apoio, questionamentos e paciência.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina de Lages, na pessoa do Engenheiro Agrônomo Sr. Saulo Luiz Poffo, e aos apicultores pelo fornecimento de mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Bentham).

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, na pessoa de Heitor Daguer e Andressa Valse, por abrirem as portas do Ministério e permitirem um inigualável ganho de experiência e conhecimento.

Agradeço também aos demais amigos e amigas que foram de alguma forma indispensáveis para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu namorado, Guilherme O. Neves, pelo apoio, compreensão e carinho em todos os momentos que precisei.

RESUMO

A *Mimosa scabrella* Bentham, conhecida como bracatinga, é uma espécie arbórea de ocorrência em clima subtropical com predominância na região sul do Brasil. Em ciclos bianuais, abelhas da espécie *Apis mellifera* recolhem o exsudado adocicado produzido por insetos denominados cochonilhas (*Tachardiella* sp.) fixados em árvores de bracatinga produzindo um mel escuro com características físico-químicas e sensoriais diferenciadas do mel floral, chamado de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Tradicionalmente, o consumo de méis é vinculado a efeitos benéficos a saúde principalmente devido ao seu poder antioxidante o qual é fortemente vinculado a presença de compostos fenólicos. Ainda, a partir da bioacessibilidade *in vitro* é possível estimar o conteúdo de determinado componente que é liberado do alimento pelo processo de digestão estando potencialmente disponível para posterior absorção pelo organismo. Apesar do crescente interesse econômico principalmente do mercado internacional no mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), poucos trabalhos sobre este tipo de mel são encontrados na literatura. Assim, este estudo buscou desenvolver e validar um método analítico para determinação de compostos fenólicos utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem*, bem como avaliar a bioacessibilidade *in vitro* destes compostos e capacidade antioxidante em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) do planalto catarinense. O método analítico proposto apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros de validação: faixa de trabalho e linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade e limites de detecção e quantificação, além de não ser evidenciado efeito de matriz, sendo considerado, portanto, adequado para a determinação de compostos fenólicos em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Observou-se que os compostos majoritários em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) foram o ácido benzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e ácido salicílico, além da presença de outros 21 compostos fenólicos terem sido verificados nas amostras analisadas. Pela primeira vez foi relatada a presença do ácido *p*-aminobenzoico, luteolina, hesperidina, isoramnetina, pinobanksin e coniferaldeído em méis de melato. Em relação a bioacessibilidade *in vitro*, pode-se considerar que a capacidade antioxidante total e o teor de compostos fenólicos totais do mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) sofreram uma redução significativa ($p < 0,05$) nos

seus valores ao final do processo de digestão *in vitro*. Apesar destes fatos, pode-se concluir que o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) apresenta capacidade antioxidante total satisfatória ao final da simulação da digestão, uma vez que perdas inferiores a 30% foram verificadas. Para os compostos fenólicos individuais pesquisados, pode-se considerar que estes apresentaram-se estáveis ou um aumento significativo ($p < 0,05$) na sua concentração foi observada ao final da digestão *in vitro*, sugerindo que os compostos fenólicos do mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) podem ser considerados potencialmente bioacessíveis.

Palavras-chave: Mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Digestão *in vitro*. Compostos fenólicos. Capacidade antioxidante. LC-ESI-MS/MS. Validação analítica.

ABSTRACT

Mimosa scabrella Benthham, or bracatinga, is an arboreal species that occurs in sub-tropical climates, with predominance in the southern region of Brazil. Every two years, *Apis mellifera* bees collect the sweet exudate produced by plant-sucking insects (*Tachardiella* sp.) that are fixed in the bracatinga trees. The bees then produce a dark honey with physicochemical and sensory characteristics that differ from floral honey, called bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) honeydew honey. The consumption of honey has traditionally been thought to provide health benefits mainly due to its antioxidant power which is strongly linked to the presence of phenolic compounds. Still, from the in vitro bioaccessibility, it is possible to estimate the amount of a particular component that is released from the food by the digestion process and is potentially available for subsequent absorption by the body. Despite growing economic interest in bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) honeydew honey, particularly in the international market, few studies on this type of honey are found. Thus, this study sought to develop and validate a method for determination of phenolic compounds using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, as well as to evaluate the in vitro bioaccessibility of these compounds and antioxidant capacity of the bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) honeydew honey of Santa Catarina plateau. The proposed analytical method showed satisfactory results for the following validation parameters: working range and linearity, accuracy, precision, robustness, selectivity, and limits of detection and quantification. In addition, the proposed method was not shown to have a matrix effect, and therefore, the method was considered suitable for the determination of phenolic compounds in bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) honeydew honey. It was noted that the major phenolic compounds in bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) honeydew honey are benzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, and salicylic acid, and 21 other phenolic compounds were verified in the samples. For the first time, the presence of *p*-aminobenzoic acid, luteolin, hesperidin, isorhamnetin, pinobanksin, and coniferaldehyde was reported in honeydew honey. In relation to in vitro bioaccessibility, it can be considered that total antioxidant capacity and total phenolic content of the bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) honeydew honey decreases significantly ($p < 0.05$) at the end of the in vitro digestion process. Despite these facts, it can be concluded that the phenolic compounds of bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham)

honeydew honey show satisfactory total antioxidant capacity at the end of the simulation of digestion since losses of less than 30% were checked. For individual phenolic compounds surveyed, it can be considered that they were stable or a significant increase ($p < 0.05$) in their concentration was observed at the end of the in vitro digestion, indicating that the phenolic compounds of bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) honeydew honey can be considered potentially bioaccessible.

Keywords: Bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) honeydew honey. In vitro digestion. Phenolic compounds. Antioxidant capacity. LC-ESI-MS/MS. Analytical validation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1 – Representação esquemática da fixação da cochonilha no caule da bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) 29
- Figura 1.2 – Representação esquemática da biossíntese de compostos fenólicos pelas vias do ácido chiquímico e do ácido malônico 34
- Figura 1.3 – Núcleo fundamental dos flavonoides e numeração do esqueleto de carbonos 36
- Figura 1.4 – Procedimento generalizado de bioacessibilidade *in vitro* 48

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1 – Cromatograma de íons totais dos compostos fenólicos em solução padrão analisados nas condições cromatográficas otimizadas 69
- Figura 2.2 – Cromatograma de íons totais dos compostos fenólicos quantificados na amostra LGA1 de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) 86

CAPÍTULO 3

- Figura 3.1 – Procedimento de digestão *in vitro* aplicado em misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) 101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 – Estudos encontrados na literatura para o teor de compostos fenólicos totais em méis florais e de melato	32
Tabela 1.2 – Principais subgrupos de compostos fenólicos e alguns representantes	36
Tabela 1.3 – Compostos fenólicos já pesquisados em méis de melato	38
Tabela 1.4 – Estudos da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> determinada pelo método DPPH e FRAP em méis florais e de melato	43
Tabela 1.5 – Estudos da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> determinada pelo método DPPH e FRAP em méis florais e de melato expressos de diferentes formas	45

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 – Informações sobre méis de melato de bracinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham)	59
Tabela 2.2 – Compostos fenólicos pesquisados, procedência e concentração da solução padrão estoque	60
Tabela 2.3 – Condições do gradiente para separação cromatográfica	61
Tabela 2.4 – Parâmetros operacionais otimizados para análise de compostos fenólicos em modo MRM positivo ou negativo	62
Tabela 2.5 – Faixa de concentração e níveis da curva de calibração de cada analito	63
Tabela 2.6 – Razão média da curva de solução padrão e sua respectiva variação aceitável para a razão da amostra	65
Tabela 2.7 – Delineamento experimental utilizando o teste de <i>Youden</i>	66
Tabela 2.8 – Condições nominais (sem alteração) e alteradas aplicadas na avaliação da robustez	67
Tabela 2.9 – Resultados de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk para a curva de calibração da solução padrão dos analitos	70
Tabela 2.10 – Resultados de homoscedasticidade pelo teste de Levene para a curva de calibração da solução padrão dos analitos	71
Tabela 2.11 – Resultados de independência pelo teste de Durbin-Watson para a curva de calibração da solução padrão dos analitos	72
Tabela 2.12 – Valores de <i>F</i> utilizados para verificação do ajuste	73

ao modelo linear para a curva de calibração da solução padrão dos analitos	
Tabela 2.13 – Valores de t utilizados para verificação de efeito de matriz	73
Tabela 2.14 – Valores da média \pm DP da razão dos íons e faixa de variação para a curva de calibração da solução padrão dos analitos	74
Tabela 2.15 – Valor mínimo e máximo de DPR (%) obtido para área do pico de cada analito para repetibilidade (precisão intra-ensaio) e reprodutibilidade parcial (precisão inter-ensaio) em curva de calibração de solução padrão	76
Tabela 2.16 – Valores médios de recuperação aparente para mel de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) em três níveis de concentração	77
Tabela 2.17 – Valores médios de LD e LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) para a curva de calibração da solução padrão dos analitos	78
Tabela 2.18 – Efeito dos parâmetros analíticos avaliados na robustez do método	79
Tabela 2.19 – Identificação e quantificação ($\mu\text{g 100 g}^{-1}$) de compostos fenólicos em méis de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham)	83
Tabela 2.20 – Valores relatados em méis de melato para os fenólicos quantificados em mel de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham)	87

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 – Amostras de mel de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) utilizadas no preparo nas misturas de mel	99
Tabela 3.2 – Efeito da digestão <i>in vitro</i> sobre o teor de compostos fenólicos totais em misturas de méis de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham)	104
Tabela 3.3 – Determinação ($\mu\text{g 100 g}^{-1}$) de compostos fenólicos individuais em misturas de mel de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) antes e após a etapa gástrica e duodenal da simulação da digestão gastrointestinal	107
Tabela 3.4 – Efeito da digestão <i>in vitro</i> sobre a capacidade antioxidante <i>in vitro</i> em misturas de méis de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham)	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Nível de concentração alto
ANOVA	Análise de variância
B	Nível de concentração baixo
CE	Do inglês <i>collision energy</i>
CXP	Do inglês <i>collision cell exit potential</i>
DAD	Do inglês <i>Diode Array Detector</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPo	Do inglês <i>declustering potential</i>
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DPR	Desvio padrão relativo
DW	Valor calculado pelo teste de Durbin-Watson
EAA	Equivalente a ácido ascórbico
EAG	Equivalente a ácido gálico
EP	Do inglês <i>entrance potential</i>
EQ	Equivalente a quercetina
ET	Equivalente a Trolox
FB	Fração bioacessível
Fe	Ferro
FRAP	Do inglês <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GC	Do inglês <i>Gas Chromatography</i>
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	Concentração em mg mL de amostra necessária para desativar 50% dos radicais DPPH
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LANAGRO-RS	Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul
LC-ESI-MS/MS	Do inglês <i>Liquid Chromatography- Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Nível de concentração médio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MRM	Do inglês <i>multiple reaction monitoring</i>

MS	Do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Do inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
ORAC	Do inglês <i>Oxygen Radical Antioxidant Activity</i>
Q1	Massa molar (g mol ⁻¹) do íon precursor
Q3	Massa molar (g mol ⁻¹) do íon de quantificação e de confirmação
Rec	Recuperação aparente
RSA	Do inglês <i>Radical Scavenging Activity</i>
R ²	Coefficiente de determinação
S-A	Sigma-Aldrich
SLAV-SC	Serviço Laboratorial Avançado de Santa Catarina
TEAC	Do inglês <i>Trolox Equivalent Antioxidant Activity</i>
TIC	Do inglês <i>Total Ion Chromatogram</i>
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina
TR	Tempo de retenção
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UPLC	Do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV-Vis	Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
CAPÍTULO 1 - Revisão bibliográfica	23
1 Mel	25
2 Abelhas (<i>Apis mellifera</i>)	25
3 Plantas apícolas no Brasil	26
3.1 Cochonilhas (<i>Tachardiella</i> sp.)	28
4 Características físico-químicas do mel de melato	30
5 Compostos fenólicos em méis	31
5.1 Teor de fenólicos totais	31
5.2 Compostos fenólicos individuais	33
6 Atividade antioxidante em méis	40
7 Bioacessibilidade e biodisponibilidade em matrizes alimentares	46
7.1 Sistema gastrointestinal <i>in vitro</i> e fatores de interação	47
7.2 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos	49
7.3 Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade em méis	51
OBJETIVOS	53
Objetivo geral	53
Objetivos específicos	53
CAPÍTULO 2 - Validação de método para determinação de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em <i>tandem</i>	55
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Amostras	58
2.1.1 Preparo das amostras	59
2.2 Reagentes e padrões	59
2.3 Instrumentação para determinação de compostos fenólicos	60
2.4 Validação analítica	63
2.4.1 Faixa de trabalho e linearidade	63
2.4.2 Efeito de matriz	64
2.4.3 Seletividade	65
2.4.4 Precisão	66
2.4.5 Exatidão	66
2.4.6 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	66
2.4.7 Robustez	66

2.5 Análise estatística	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.1 Otimização de método analítico em LC-ESI-MS/MS	68
3.2 Validação analítica	70
3.2.1 Faixa de trabalho e linearidade	70
3.2.2 Efeito de matriz	74
3.2.3 Seletividade	75
3.2.4 Precisão	76
3.2.5 Exatidão	77
3.2.6 Limites de detecção e quantificação	78
3.2.7 Robustez	79
3.3 Aplicação do método em compostos fenólicos de amostras de mel de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham)	82
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
CAPÍTULO 3 - Bioacessibilidade <i>in vitro</i> de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em méis de melato de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham)	93
1 INTRODUÇÃO	95
2 MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1 Amostras	97
2.2 Reagentes e padrões	97
2.3 Instrumentação	98
2.4 Preparo das amostras	99
2.5 Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	100
2.5.1 Preparo das soluções gástrica e duodenal	100
2.5.2 Procedimento de digestão <i>in vitro</i>	100
2.6 Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu	101
2.7 Identificação e quantificação de compostos fenólicos utilizando LC-ESI-MS/MS	102
2.8 Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	102
2.8.1 Capacidade antioxidante pelo método de desativação de radicais DPPH	102
2.8.2 Capacidade antioxidante pelo método FRAP	103
2.9 Determinação da fração bioacessível de teor de fenólicos totais, compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante	103
2.10 Análise estatística	104
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	119
REFERÊNCIAS	121

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com ocorrência típica na Floresta Ombrófila Mista, pertencente ao bioma Mata Atlântica (CARVALHO, 2002; STEENBOCK et al., 2011), a *Mimosa scabrella* Bentham, conhecida também como bracatinga é uma espécie arbórea nativa de climas frios, com distribuição predominante na região sul do Brasil (DAHMER et al., 2013; SOMARRIBA; KASS, 2001).

Por ser considerada uma árvore de rápido crescimento (CARPANEZZI et al., 1988; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014), esta espécie é muito explorada por pequenos e médios produtores de maneira isolada ou juntamente com outras culturas agrícolas, contribuindo no desenvolvimento sócio-econômico dessas regiões (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Assim, a sua exploração se dá basicamente na forma do uso da madeira, do carvão, da sua contribuição na recuperação de solos deficientes, como espécie sombreadora de outras cultivares, além da produção de mel (CARPANEZZI et al., 1988; CARVALHO, 2002; DAHMER et al., 2013; SOMARRIBA; KASS, 2001).

No caso da produção de mel por abelhas da espécie *Apis mellifera*, a bracatinga apresenta grande importância na manutenção das colmeias através do fornecimento de néctar e pólen nos períodos de floração (MARTINS; ORTH; NARDI, 2003; MOREIRA et al., 2011; ORTH; MARTINS, 2003), com auge no início do inverno até próximo a setembro nos estados do Paraná e Santa Catarina (CARVALHO, 2002) gerando a produção do mel floral de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Além disso, a associação com insetos denominados cochonilhas (*Tachardiella* sp.) fornece secreções adocicadas (CARPANEZZI et al., 1988; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014) para a manutenção das colmeias nos meses de escassez de néctar e pólen, que são geralmente de janeiro a maio em períodos bianuais (MARTINS; ORTH; NARDI, 2003). A partir desse exsudado, é produzido o mel conhecido como mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) (MOREIRA et al., 2011; ORTH; MARTINS, 2003).

Considera-se como característica de méis de melato de diferentes origens botânicas, apresentar uma coloração mais escura além de teores maiores de proteínas, minerais, polissacarídeos e maior pH em comparação a méis florais (CARPANEZZI et al., 1988; MARENDIA et al., 2011; MARTINS; ORTH; NARDI 2003; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). No caso do mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), este vem ganhando espaço no mercado

internacional devido principalmente aos seus possíveis efeitos terapêuticos (CAMPOS et al., 2003; MARIANO-DA-SILVA; MARIANO-DA-SILVA; COSTA-NETTO, 2011) e características sensoriais (MARENDA et al., 2011).

Os possíveis efeitos benéficos a saúde, atribuídos ao consumo de mel, são vinculados a presença de compostos bioativos (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012) tais como minerais, aminoácidos, compostos fenólicos entre outros (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; PÉREZ et al., 2007), onde a capacidade antioxidante *in vitro* de méis é uma das características mais estudadas nos últimos anos (BUENO-COSTA et al., 2015; ESCUREDO et al., 2013; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). Apesar de já ser conhecido que diversos constituintes do mel podem contribuir na capacidade antioxidante deste, os compostos fenólicos são os componentes mais estudados e vinculados a tais propriedades apresentadas por méis (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; BERTONCELJ et al., 2007; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; HUSSEIN et al., 2013; KHALIL et al., 2012; MANYI-LOH; CLARKE; NDIP, 2011). Entretanto, apesar da grande importância da correlação da capacidade antioxidante com os compostos fenólicos, poucos estudos sobre compostos fenólicos individuais em méis de melato de diferentes origens botânicas são encontrados na literatura até o presente momento.

Atualmente, o comportamento *in vivo* de diversos compostos em méis podem ser previamente estudados através da bioacessibilidade *in vitro*, o qual constitui numa ferramenta útil para a aquisição de informações sobre possíveis influências promovidas pelo sistema gastrointestinal e pela própria matriz alimentar na potencialidade de um ou vários componentes serem absorvidos pelo organismo (ALMINGER et al., 2014; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

Até o momento, são encontrados na literatura poucos estudos sobre a caracterização de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) (CAMPOS et al., 2003; MARIANO-DA-SILVA; MARIANO-DA-SILVA; COSTA-NETTO, 2011). Em conjunto com este fato, a escassez de informações sobre compostos fenólicos em méis de melato, estimulam este tipo de estudo em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth), uma vez que não são relatados dados sobre estes componentes nesta matriz alimentar na literatura até este momento, bem como sobre a sua capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais. Além disso, a bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos individuais em méis não são reportados na literatura até o presente momento, assim como informações sobre a

bioacessibilidade *in vitro* referente a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais em méis são limitadas. Portanto, a avaliação dos compostos fenólicos provindos do mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Bentham) e a sua capacidade antioxidante em um sistema de digestão *in vitro*, constituem numa boa ferramenta para estabelecer uma relação sobre o comportamento destes no sistema *in vivo* e contribui com dados inéditos nessa área, com destaque para os compostos fenólicos.

Portanto, buscando a valorização de um produto regional pouco explorado e com altos volumes de exportação, bem como pela escassez de informações sobre essa matriz, com destaque para a ausência de estudos científicos, até o momento, sobre os compostos fenólicos individuais, capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais neste tipo de mel, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para determinação de compostos fenólicos utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* e avaliar a bioacessibilidade *in vitro* destes compostos e capacidade antioxidante em méis de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Bentham) da região do planalto de Santa Catarina.

CAPÍTULO 1 - Revisão bibliográfica

1 Mel

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2000) o mel é um produto alimentício produzido por abelhas melíferas (*Apis mellifera*). O mel pode ser produzido a partir do néctar das flores, sendo este mel classificado como mel floral, ou principalmente a partir de secreções de partes vivas de plantas ou de insetos sugadores destas plantas, sendo este tipo de mel chamado de mel de melato (BRASIL, 2000; CAMPOS et al., 2003; MARENDIA et al., 2011). Além disso, por intermédio do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel (BRASIL, 2000), são apresentadas ainda definições para ambos os méis, características sensoriais, físico químicas, aditivos, contaminantes, higiene, rotulagem, métodos de análise e amostragem, dentre outras informações. Após o recolhimento do néctar ou das secreções adocicadas, as abelhas as transformam e combinam com substâncias próprias, armazenando e deixando madurar esta matéria prima nos favos da colmeia gerando ao final deste processo o mel (BRASIL, 2000).

O mel é considerado uma matriz complexa (CAMPOS et al., 2003; MARENDIA et al., 2011) contendo centenas de compostos (AL et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010). Os componentes majoritários são os carboidratos, variando de 70 a 80 %, sendo frutose e glicose os principais monossacarídeos encontrados (MARENDIA et al., 2011), o que torna este produto um alimento de alto valor energético (KAROUI et al., 2007; MARIANO-DA-SILVA; MARIANO-DA-SILVA; COSTA-NETTO, 2011). A água é o segundo constituinte encontrado em maior quantidade (MANYI-LOH; CLARKE; NDIP, 2011), seguido da presença de vários outros componentes como ácidos orgânicos, minerais, vitaminas, enzimas, polifenóis, carotenoides, lipídios, componentes aromáticos, aminoácidos, entre outros, sendo que muitos desses são adicionados pelas abelhas, outros são derivados da matéria prima (néctar, pólen ou melato) ou ainda formados ao longo da maturação do mel (KAROUI et al., 2007; MARENDIA et al., 2011; MARIANO-DA-SILVA; MARIANO-DA-SILVA; COSTA-NETTO, 2011).

2 Abelhas (*Apis mellifera*)

As abelhas desempenham papel muito importante na polinização e consequente manutenção de ecossistemas (MANTILLA et al., 2012; MENDES et al., 2009; MENDONÇA et al., 2008), além de vários

produtos comerciais serem obtidos, tais como ceras, geleia real, pólen, mel, entre outros (MARCHINI; REIS; MORETI, 2006).

Existem algumas espécies de abelhas nativas do Brasil, porém hoje as espécies de abelhas mais utilizadas comercialmente para a produção de mel pertencem ao gênero *Apis*, que se dividem em sete espécies dentre as quais encontram-se a *Apis mellifera*. Estas abelhas pertencem à ordem Hymenoptera e superfamília Apoidea (MARCHINI; REIS; MORETI, 2006; MENDES et al., 2009). Segundo Pereira et al. (2003), provavelmente as subespécies *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera carniça* e *Apis mellifera ligustica* foram introduzidas no Brasil entre os anos de 1840 a 1880 pelos europeus. A produção de mel era pequena e basicamente para consumo próprio. Entretanto, por volta de 1950, houve um grande decréscimo na produção apícola devido a problemas de sanidade dessas abelhas, o que levou a necessidade do aumento da resistência destas. Assim, foram realizados estudos com abelhas africanizadas e após a liberação acidental destas, ocorreu o cruzamento entre as abelhas europeias introduzidas no Brasil e as abelhas africanas resultando, portanto, em abelhas com maior resistência às doenças e com maior capacidade produtiva (PEREIRA et al., 2003). Hoje, essas abelhas africanizadas, como são chamadas, representam a maior parcela das abelhas utilizadas para a produção de mel no Brasil (MANTILLA et al., 2012; PEREIRA et al., 2003).

3 Plantas apícolas no Brasil

A relação entre abelhas e plantas é baseada numa dependência mútua, onde as plantas necessitam da abelha como agente polinizador e as abelhas necessitam da planta como fonte de pólen e néctar (BRAGA et al., 2014). No Brasil, diversas plantas podem ser exploradas como plantas apícolas, principalmente por abelhas da espécie *Apis mellifera*, variando de acordo com a região (BARTH, 2014).

Venturieri e Fernandes (2014) destacaram algumas plantas apícolas presentes na região amazônica, como o açaí (*Euterpe oleracea* Mart), o caju (*Anacardium occidentale* L.) e a tapiririca (*Tapirira guianensis* Aubl.). Já em trabalho realizado no estado do Maranhão, Muniz e Brito (2007) observaram que dependendo da região pesquisada, as principais espécies apícolas mudam, porém, pode-se destacar as espécies pertencentes as famílias Arecaceae, Mimosaceae, Caesalpiniaceae, Anacardiaceae e Rubiaceae. Já em relação a região sudeste, Barth (2014), destaca-se o gênero *Eucalyptus*, amplamente cultivado no Brasil, espécies dos gêneros *Citrus* sp., *Salvia* sp., *Mimosa*

entre outras, como importantes fontes apícolas. Em levantamento das principais espécies apícolas no Rio Grande do Sul, as famílias mais representativas foram a Myrtaceae seguida da Anacardiaceae, podendo-se destacar a guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg), guamirim (*Myrceugenia euosma* (Berg) Legr.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (WOLFF et al., 2008).

Bender, Pereira e Souza (2014), citam que dentre a florada utilizada na produção de mel nas diferentes regiões do estado de Santa Catarina, destacam-se as flores de eucalipto, de vassoura (carqueja), da bracatinga, da uva-do-Japão, da laranja e silvestres, sendo que a produção de mel a partir de flores de maçã nos períodos de florada desta fruta na região serrana do estado também ocorre. Salomé e Orth (2014) realizaram no estado de Santa Catarina um levantamento das principais plantas apícolas, onde as principais famílias foram Asteraceae, seguida da Myrtaceae e Fabaceae. A maior porcentagem de florescimento das espécies de plantas apícolas foi observada normalmente no período de agosto a novembro, em diferentes municípios, e a menor porcentagem de florescimento entre abril e julho. Segundo os autores, por nenhuma das plantas florescerem o ano inteiro destaca-se a importância do exsudato produzido a partir da associação entre bracatinga e cochonilhas em períodos de falta de floradas como uma maneira de suprir a escassez de néctar e pólen.

Pertencente a família Fabaceae (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014), gênero *Mimosa* L. (LIMA; MANSANO; TOZZI, 2013), a *Mimosa scabrella* Bentham, também conhecida como bracatinga, é uma espécie arbórea de ocorrência em clima subtropical (CARPANEZZI et al., 1988; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Esta espécie tem predominância na região sul (Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina) (DAHMER et al., 2013; SOMARRIBA; KASS, 2001), além de outras localidades como Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (ANGELI, 2003; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014).

Mazuchowski, Rech e Toresan (2014) destacam que as maiores áreas de ocorrência da bracatinga são observadas na região sul do Brasil em regiões com altitudes acima de 700 m, com temperaturas anuais relativamente baixas e sem déficit hídrico, sendo que em Santa Catarina, a sua ocorrência é observada em maior concentração na região do planalto. Moreira et al. (2011) e Steenbock et al. (2011) citam que o cultivo dessa espécie é ainda forte em assentamentos de reforma agrária na região noroeste e planalto do estado de Santa Catarina. São encontradas duas variedades botânicas da bracatinga, ambas com

ocorrência natural restrita ao Brasil: a variedade *scabrella* (bracatinga comum) e variedade *aspericarpa* (bracatinga argentina). Dentro da variedade *scabrella* estão incluídas as espécies popularmente chamadas de bracatinga vermelha e a bracatinga branca (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014).

O cultivo da bracatinga por pequenos e médios produtores de maneira isolada ou juntamente com outras culturas agrícolas representa grande importância socioeconômica (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Esta espécie tem diversos usos, como madeira para lenha ou carvão (CARPANEZZI et al., 1988; SOMARRIBA; KASS, 2001), além de que quando ocorre o seu corte ou queima, esta espécie não rebrota, somente se regenera pela germinação das sementes presentes no solo, fato que facilita o controle de invasões indesejadas (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). A bracatinga também pode ser explorada para a produção de mel (CARVALHO, 2002; DAHMER et al., 2013), apresentando grande importância na apicultura (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Esta espécie fornece néctar e pólen principalmente entre os meses de julho a setembro em Santa Catarina para a produção de mel floral (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014; MOREIRA et al., 2011; ORTH; MARTINS, 2003) e durante épocas de falta destes, a associação entre a bracatinga e cochonilhas, gera a produção de exsudatos que são excretados pelas cochonilhas e coletados por abelhas para produção de mel de melato (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014; MOREIRA et al., 2011; ORTH; MARTINS, 2003).

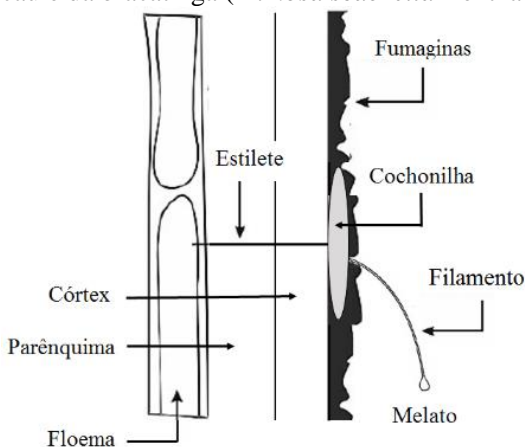
3.1 Cochonilhas (*Tachardiella* sp.)

Associadas as bracatingas, um dos parasitas que podem ser encontrados são os insetos conhecidos popularmente como cochonilhas (CARPANEZZI et al., 1988; CARVALHO, 2002). Esses insetos pertencem à ordem Homoptera, família Lacifferidae (MARTINS; ORTH; NARDI, 2003; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Pertencente a esta ordem, as cochonilhas do gênero *Tachardiella* sp. são relacionadas com a produção de secreções a partir da sua associação com bracatinga, sendo essas secreções posteriormente utilizados por abelhas principalmente da espécie *Apis mellifera* para a produção de mel de melato (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Além das cochonilhas do gênero *Tachardiella* sp., Witter et al. (2010) também identificaram cochonilhas pertencentes à família Stigmaticocidae,

gênero *Stigmatococcus*, como a cochonilha associada a bracatinga em Campos de Cima da Serra, Rio Grande do Sul.

Segundo Carpanezzi et al. (1988) e Mazuchowski, Rech e Toresan (2014), as cochonilhas do gênero *Tachardiella* sp. se encontram principalmente nos ramos e caule da bracatinga, onde sugam a seiva da planta causando certo enfraquecimento da mesma e dificuldades de respiração e transpiração. Entretanto, Carvalho (2002) cita que a presença destes insetos e outros parasitas não causam grandes limitações no desenvolvimento da bracatinga. As fêmeas do gênero *Tachardiella*, quando adultas ou próximas a este estágio, são sedentárias apresentando uma carapaça rígida e espessa de cor pardo-avermelhada que tem a função de proteger o inseto (MARTINS; ORTH; NARDI, 2003). Como apresentado na Figura 1.1, nesta fase, as cochonilhas fixam-se principalmente sobre o caule e ramos de plantas hospedeiras como a bracatinga (CARPANEZZI et al., 1988; MARTINS; ORTH; NARDI, 2003), estas então inserem os seus estiletes até atingir o floema da planta onde a seiva é sugada para alimentação do inseto. A partir de um filamento ceroso branco emitido pelas cochonilhas, são excretadas secreções açucaradas, também chamados de melatos (MARTINS; ORTH; NARDI, 2003), na forma de gotas que são posteriormente coletadas por abelhas da espécie *Apis mellifera*, para produção de mel conhecido como mel de melato (CARPANEZZI et al., 1988; MARTINS; ORTH; NARDI, 2003).

Figura 1.1 – Representação esquemática da fixação da cochonilha no caule da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthman)



Fonte: Adaptado de Chamorro, Nates-Parra e Kondo (2013).

Segundo Mariano-Da-Silva, Mariano-Da-Silva e Costa-Netto (2011), o melato geralmente contém fumaginas, que são resultado da proliferação de fungos do gênero *Capnodium* neste meio. Essas fumaginas também podem ser frequentemente encontradas sobre a carapaça rígida das cochinilhas (MARTINS; ORTH; NARDI, 2003).

Devido ao ciclo de vida destas cochinilhas apresentar um padrão bianual, a produção de melato por estes insetos também apresenta um padrão bianual (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014; WITTER et al., 2010). Geralmente, as secreções são produzidas de forma mais intensa entre os meses de janeiro a maio, período em que, por consequência, ocorre a maior produção de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) (CAMPOS et al., 2003; MARTINS; ORTH; NARDI, 2003; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014).

4 Características físico-químicas do mel de melato

Mariano-Da-Silva, Mariano-Da-Silva e Costa-Netto (2011) relataram que em vários países o mel de melato é valorizado por suas possíveis propriedades medicinais. Mesmo sendo considerado inferior aos méis florais do ponto de vista sensorial (MARENDIA et al., 2011) e meno valorizado no mercado interno, o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) apresenta grande aceitação no mercado internacional (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014).

O mel de melato apresenta cor, consistência e sabor próximos ao melado de cana-de-açúcar (CARPANEZZI et al., 1988) além de dificilmente sofrer cristalização, característica relacionada diretamente ao baixo teor de glicose presente neste tipo de mel em relação a méis florais (CAMPOS et al., 2003; MARIANO-DA-SILVA; MARIANO-DA-SILVA; COSTA-NETTO, 2011). Em comparação com o mel floral, o mel de melato apresenta ainda pH maior e menor teor de frutose, além de ser considerado rico em sais minerais, nitrogênio (CAMPOS et al., 2003; MARENDIA et al., 2011; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014), proteínas, polissacarídeos (CARPANEZZI et al., 1988) e oligossacarídeos melezitose e rafinose (BOGDANOV et al., 2008).

5 Compostos fenólicos em méis

5.1 Teor de fenólicos totais

Características benéficas atribuídas ao mel se devem a presença de diversos compostos considerados bioativos (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; KHALIL; SULAIMAN; BOUKRRA, 2010) tais como: ácidos orgânicos, aminoácidos, produtos de reação de Maillard, peptídeos, enzimas, minerais, ácido ascórbico, vitaminas, proteínas, compostos fenólicos, entre outros (CARRATÙ et al., 2011; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; KHALIL; SULAIMAN; BOUKRRA, 2010; PÉREZ et al., 2007).

Atualmente, a determinação do teor de compostos fenólicos totais em méis é extensivamente realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (AL et al., 2009; A-RAHAMAN et al., 2013; BERETTA et al., 2005; KOWALSHI, 2013; O'SULLIVAN et al., 2013). Este método se baseia na capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu por compostos fenólicos, independente da sua estrutura química (MAGALHÃES et al., 2008). O reagente de Folin-Ciocalteu, constituído principalmente por compostos de fosfomolibdênio e fosfotungstênio (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; HAJAJI et al., 2010; KHODDAMI; WIKES; ROBERTS, 2013), quando em contato com agentes redutores, como os compostos fenólicos, e em meio alcalino, sofrem redução formando um complexo cromóforo fosfomolibdênio-fosfotungstênio de coloração azul (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013) com absorção na região do visível (entre 750-765 nm) (MAGALHÃES et al., 2008). Os reagentes do Folin-Ciocalteu reagem com diversas classes de compostos fenólicos (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013), mas também podem reagir com outras substâncias redutoras como ácido ascórbico, aminas aromáticas e açúcares (KHODDAMI; WIKES; ROBERTS, 2013). Por isso, em alguns casos pode ser explorado também como uma forma de avaliar a capacidade de redução total de uma amostra. Os resultados são expressos comumente em mg equivalentes em ácido gálico (EAG) a partir da interpolação com curva padrão (MAGALHÃES et al., 2008).

Na Tabela 1.1, encontram-se o teor de fenólicos totais relatados em alguns estudos realizados em méis florais e de melato.

Tabela 1.1 – Estudos encontrados na literatura para o teor de compostos fenólicos totais em méis florais e de melato

Origem geográfica	Origem botânica do mel de melato	Teor médio de fenólicos totais (mg EAG 100 g ⁻¹)		Referência bibliográfica
		Mel de melato	Mel floral	
Romênia	Multifloral	23,00 - 125,0	2,00 - 45,00	Al et al. (2009)
Malásia	Acácia	55,00	38,38 - 60,62	A-Rahaman et al. (2013)
ni	Multifloral	25,56	6,70 - 78,96	Beretta et al. (2005)
Eslovênia	Silvestre (árvores coníferas e latifoliadas), abeto-branco (<i>Abies alba</i>), abeto-falso (<i>Picea abies</i>)	21,75 - 24,14	4,48 - 19,99	Bertoncelj et al. (2007)
Eslovênia	Silvestre (árvores coníferas e latifoliadas), abeto-branco (<i>Abies alba</i>), abeto-falso (<i>Picea abies</i>)	21,04 - 23,25	4,49 - 19,17	Bertoncelj et al. (2011)
Túrcia	<i>Tilia platyphyllos</i> , <i>Quercus</i> sp. L.	41,20 - 120,0	16,02 - 105,5	Can et al. (2015)
Espanha	ni	140,6	78,40 - 181,0	Escuredo et al. (2013)
Espanha	<i>Quercus pyrenaica</i>	132,3	-	Flores, Escuredo e Seijo (2015)
Transilvânia	ni	53,91 - 286,6	40,00 - 203,9 / 33,42 - 167,3 (<i>blend</i>)	Giorgiana et al. (2008)
ni	ni	84,68 - 109,2	37,95 - 128,4	Kowalshi (2013)
República Tcheca	ni	19,26 - 24,25	8,25 - 20,89	Lachman et al. (2010b)
Espanha	ni	101,0	61,0	Lorente, Carretero e Martín (2008)
Diversos locais	ni	11,30 - 22,91	2,04 - 199,6	Maurya et al. (2014)
Burkina Faso	ni	113,0 - 114,7	32,59 - 100,4	Meda et al. (2005)
Transilvânia	ni	93,50 - 144,9	-	Otilia et al. (2008)
Turquia	Pinheiro	3,54 - 36,59	-	Özkök, D'arcy e Sorkun (2010)
Polónia	ni	6,08	4,46 - 15,04 / 6,78 (<i>blend</i>)	Socha et al. (2011)
ni	<i>Salix</i> spp.	119,8	50,86	Tuberoso et al. (2011)
Espanha	ni	0,06 - 0,23	0,02 - 0,11	Vela, Lorenzo e Pérez (2007)
Polónia	ni	58,24 - 71,88	17,57 - 189,5 / 71,84 (<i>blend</i>)	Wilczyńska (2010)

Legenda: ni (não identificado/informado); - (não analisado); EAG – equivalente a ácido gálico.

Fonte: Próprio autor (2015).

Em relação aos estudos listados na Tabela 1.1, nota-se que normalmente os méis de melato, quando comparados aos méis florais, apresentam valores intermediários para o teor de fenólicos totais, como nos estudos de Escuredo et al. (2013) e Kowalshi (2013), e algumas

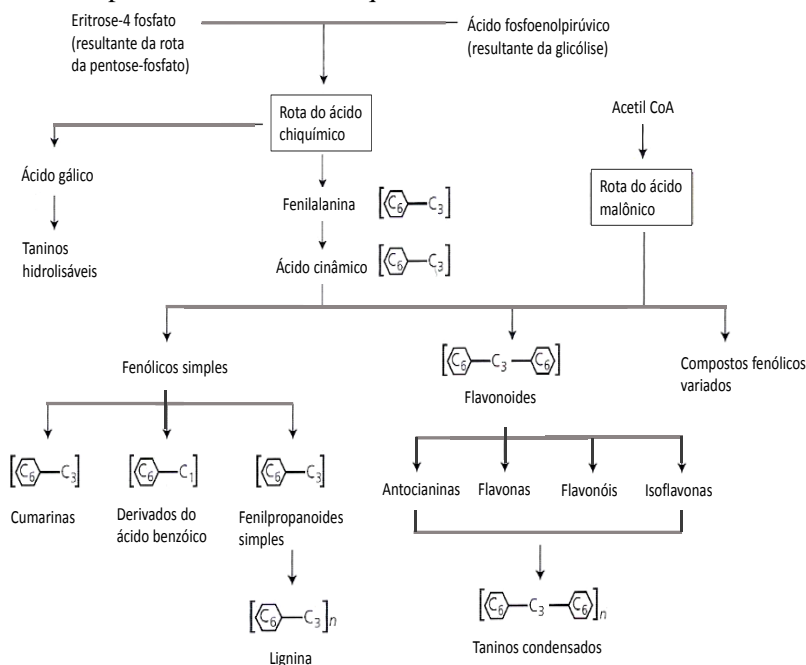
vezes elevados, como encontrado por Bertoncelj et al. (2011), Lorente, Carretero e Martín (2008) e Tuberoso et al. (2011). Vela, Lorenzo e Pérez (2007) encontraram maiores valores em relação ao teor de fenólicos totais para mel de melato (0,06 – 0,23 mg EAG 100 g⁻¹) comparativamente ao mel floral (0,02 – 0,11 mg EAG 100 g⁻¹), sendo ambos os resultados inferiores aos demais estudos. Giorgia et al. (2008) também reportaram valores superiores para mel de melato (53,91 – 286,6 mg EAG 100 g⁻¹) em relação ao mel floral (40,00 – 203,9 mg EAG 100 g⁻¹), sendo os maiores resultados para ambos os tipos de méis superiores aos demais estudos citados na Tabela 1.1.

Por já se saber que outros compostos além dos compostos fenólicos podem ser quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu (KHODDAMI; WIKES; ROBERTS, 2013), se torna de suma importância a determinação de compostos fenólicos individuais, a fim de complementar as informações sobre esta classe de compostos.

5.2 Compostos fenólicos individuais

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário de fungos, bactérias e especialmente de plantas, caracterizados por conter em sua estrutura um grupo fenol, constituído de uma hidroxila ligada a um anel aromático (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; SIMÕES et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009). Especialmente em vegetais, devido a sua diversidade química, estes compostos desempenham diferenciadas ações, como no sistema de defesa, na atração de polinizadores, na proteção contra radiação ultravioleta, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2009). Na Figura 1.2 esta representada a biossíntese de compostos fenólicos pelas vias do ácido chiquímico e do ácido malônico.

Figura 1.2 – Representação esquemática da biossíntese de compostos fenólicos pelas vias do ácido chiquímico e do ácido malônico



Legenda: Esqueleto básico de carbonos entre colchetes indica um anel aromático ligado a uma cadeia carbônica de tamanho diferenciado.

Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2009).

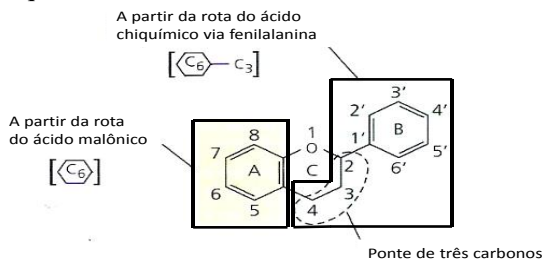
Como apresentado na Figura 1.2, a síntese dos compostos fenólicos é realizada basicamente a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. A via do ácido chiquímico está envolvida na formação de grande parte dos fenólicos vegetais, mas também está presente em fungos e bactérias (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009), enquanto que a via do ácido malônico é mais importante em fungos e bactérias (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A partir da via do ácido chiquímico ocorre a formação de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, triptofano e tirosina (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009) e também a produção do ácido gálico (TAIZ; ZEIGER, 2009). A partir da polimerização, em especial, do ácido gálico e açúcares, são formados os

taninos hidrolisáveis, considerado um grupo polimérico heterogêneo (SIMÕES et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009). A partir da fenilalanina, as classes de compostos fenólicos mais encontradas em plantas são formadas pela ação da enzima fenilalanina amônia liase sobre a fenilalanina, dando origem a formação do ácido cinâmico, o qual é o composto precursor para a formação das subclasses de fenilpropanóides simples (como os ácidos *trans*-cumárico, *p*-cumárico e seus derivados), cumarinas ou lactonas de fenilpropanóides (como umbeliferona) e derivados do ácido benzóico (como ácido salicílico e vanilina) (TAIZ; ZEIGER, 2009). Quimicamente, estes compostos apresentam um anel aromático onde ocorre a substituição de pelo menos um átomo de hidrogênio por um grupo hidroxila (OH^-) (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005). Ainda, estruturas mais complexas como as ligninas são formadas a partir de fenilpropanóides simples (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; SIMÕES et al., 2001).

A partir da rota do ácido chiquímico e do ácido malônico são formados os compostos pertencentes a classe dos flavonóides, que podem ser subdivididos em 4 grandes subclasses principais, devido principalmente ao seu grau de oxidação, compreendendo as antocianinas (glicosídeos de antocianidinas), flavonas, flavonóis e isoflavonóides (TAIZ; ZEIGER, 2009). Outras subclasses importantes são as chalconas e as flavanonas, que são precursoras para a formação dos compostos pertencentes as subclasses das antocianinas, flavonas, flavonóis e isoflavonóides (SIMÕES et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009). Quimicamente, a estrutura básica dos flavonóides consiste num esqueleto de difenil propano constituído de dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (BEHLING et al., 2004), como apresentado na Figura 1.3, podendo em muitos casos ocorrerem naturalmente na forma de glicosídeos (SIMÕES et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009). Esta classe de compostos fenólicos contribui em diversos processos biológicos devido principalmente a sua efetividade como composto antioxidante (BEHLING et al., 2004; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009). Ainda, a partir da polimerização de unidades de flavonóides são formados os taninos condensados, também chamados em alguns casos de pro-antocianidinas, pois ao serem hidrolisados liberam as antocianidinas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Figura 1.3 – Núcleo fundamental dos flavonoides e numeração do esqueleto de carbonos



Fonte: Taiz e Zeiger (2009).

O grupo dos ácidos fenólicos, o qual compreende os compostos derivados do ácido benzóico e cinâmico (SIMÕES et al., 2001), e dos flavonóides podem ser destacados como os grupos mais importantes de compostos fenólicos (HELENO et al., 2015; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009). De acordo com a Tabela 1.2, são apresentados alguns compostos fenólicos já conhecidos, onde Simões et al. (2001) classificam o ácido gálico como um derivado do ácido benzoico.

Tabela 1.2 – Principais subgrupos de compostos fenólicos e alguns representantes

Grupo	Subgrupo	Alguns compostos fenólicos já conhecidos
Ácido fenólico	Derivados do ácido benzoico	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido protocatequico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), ácido vanílico, ácido gentísico, ácido gálico, ácido sirínico, ácido elágico (dímero de condensação do ácido gálico), ácido <i>p</i> -metoxibenzoico (ácido anísico), ácido 3,4-dimetoxibenzoico (ácido verátrico), ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.
	Derivados do ácido cinâmico	Ácido <i>p</i> -cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido <i>o</i> -cumárico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico.
Cumarina	-	Umbeliferona, esculetina, escopoletina, esculina.
Flavonoide	Chalconas	Buteína, coreopsina, isoliquiritina, mareína, okanina.
	Flavanonas	Alpinetina, eriodictiol, hesperidina, hesperitina, naringenina, naringina, pinocembrin, pinostrobin.
	Di-hidroflavonois	Aromadendrina, alpinona, lecontina, pinobanksin, strobobanksina.
	Flavonóis	Galangina, isorametina, miricetina, quercitrina, quercetina, rutina, ramnetina, kaempferol, isetina, herbacetina.
	Flavonas	Acacetina, apiína, apigenina, crisina, luteolina, tricetina, tricina, crisoeiol.
	Isoflavonoides (isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanos, pterocarpanos, cumestanos)	Daidzeína, formonononina, genisteína, genistina, kievitona, vestitona, equol, sativan, medicarpina, cumestrol.
	Flavanois/flavan-3-óis	Epigallocatequina galato, catequina, epicatequina, galocatequina.

Fonte: Adaptado de Simões et al. (2001), Taiz e Zeiger (2009) e Tsao (2010).

Em méis, os compostos fenólicos vem sendo amplamente investigados devido principalmente a possibilidade do seu uso como marcadores de autenticidade (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; BIESAGA; PYRZYNSKA, 2013; SOCHA et al., 2011) e devido as suas propriedades antioxidantes (KHALIL; SULAIMAN; BOUKRRA, 2010; MANYI-LOH; CLARKE; NDIP, 2011).

Em relação a identificação e quantificação de compostos fenólicos em méis florais e de melato, pode-se destacar como os flavonoides e ácidos fenólicos mais encontrados e pesquisados a miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina, crisina, galangina, naringenina, pinocembrin, acacetina, isoramnetina, pinobanksin, luteolina, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; ESCRICHE et al., 2014; HAROUN et al., 2012; PÉREZ-PÉREZ; VIT; HUQ, 2013; TOMÁS-BARBENÁN, et al., 2001; TRAUTVETTER; KOELLING-SPEER; SPEER, 2009), sendo alguns compostos encontrados em vários tipos de méis, enquanto outros são mais específicos de certas variedades de méis, como a hesperetina (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012).

A determinação destes compostos é comumente realizada por cromatografia líquida acoplada a detectores de arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*), UV-Vis (ultravioleta e visível) e espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (CAN et al., 2015; ESCRICHE et al., 2014; HAROUN et al., 2012; MATHUMITHA et al., 2014; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009; SILICI; SARIOGLU; KARAMAN, 2013; TOMÁS-BARBENÁN, et al., 2001; TRAUTVETTER; KOELLING-SPEER; SPEER, 2009), porém, o uso de outras técnicas analíticas como cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (DAHER; GÜLAÇAR, 2008) e eletroforese capilar (ARRÁEZ-ROMÁN et al., 2006; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009; WANG; FU; WANG, 2007) também são reportadas.

A Tabela 1.3 mostra estudos relacionados a presença de compostos fenólicos em méis de melato de diferentes origens, sendo que a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é a técnica mais utilizada, pois apesar da necessidade de preparo da amostra (pré-concentração e/ou *clean up*), ainda assim se torna menos laboriosa quando comparada a cromatografia à gás, a qual demanda uma etapa adicional de derivatização. Além disso, a separação dos analitos promovida por

HPLC em conjunto com a discriminação e monitoramento de diversos analitos por meio da espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS, do inglês *Tandem Mass Spectrometry*), torna possível a identificação e quantificação de compostos não totalmente separados, na presença de interferentes, mesmo em concentrações muito baixas (HARRIS, 2012; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Tabela 1.3 – Compostos fenólicos já pesquisados em diferentes méis de melato (continua)

Compostos investigados	Compostos detectados	Técnica analítica / Preparo de amostra	Referência bibliográfica
Ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, catequina, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido sirínico, epicatequina, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, rutina, quercetina, apigenina, kaempferol, isoramnetina	Todos os compostos pesquisados, com exceção da catequina, ácido clorogênico, ácido vanílico, quercetina, kaempferol e isoramnetina	HPLC-UV-Vis / Extração líquido-líquido	Can et al. (2015)
Ácido benzoico, ácido salicílico, ácido cinâmico, metil siringato, ácido ferúlico, pinocembrin, crisina, acacetina, galangina, pinostrobin chalcona, pinobanksin chalcona, 5-metoxi-3,7-dihidroxi flavanona, tectocrisina.	Todos os compostos pesquisados	GC-MS / Microextração em fase sólida	Daher, Güllaçar (2008)
Naringenina, hesperitina, ácido cafeico, ácido <i>p</i> -cumárico, pinocembrin, crisina, galangina, quercetina, kaempferol, miricetina	Todos os compostos pesquisados	HPLC-UV-Vis / Extração em fase sólida	Escriche et al. (2014)
Ácido protocatecuico, ácido cafeico, ácido sirínico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, metil siringato, ácido elágico, miricetina, quercetina, luteolina, apigenina, kaempferol, pinocembrin, crisina, acacetina	Todos os compostos pesquisados, com exceção da miricetina, luteolina e kaempferol	HPLC-UV-Vis / Extração em fase sólida	Haroun et al. (2012)
Ácido benzoico, ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico), ácido cinâmico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, siringaldeído, metil siringato, ácido 4-hidroxicinâmico.	Todos os compostos pesquisados	GC-MS / Extração ultrasonica com solvente assistida	Jerkovic e Marijanovic (2010)
Ácido ferúlico, crisina, apigenina	Todos os compostos pesquisados	HPLC-DAD / Extração em fase sólida	Lachmann et al. (2010a)
Ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, epicatequina, ácido cumárico, ácido ferúlico, quercetina, pinocembrin, <i>myricerin</i> , luteolina, kaempferol, crisina, ácido vanílico, ácido benzoico, ácido cinâmico, <i>isohammeti</i> , pinostrobin, ácido elágico, ácido sirínico.	Apenas o ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, epicatequina, ácido cumárico e ácido ferúlico	HPLC-DAD / Extração em fase sólida	Silici, Sarioglu, Karaman (2014)
Ácido gálico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, ácido sirínico, ácido cafeico, ácido sinápico, ácido clorogênico, crisina, galangina, hesperitina, kaempferol, quercetina, naringenina	Todos os compostos pesquisados, com exceção da crisina e galangina	HPLC-UV-Vis / Extração líquido-líquido	Socha et al. (2011)

Tabela 1.3 – Compostos fenólicos já pesquisados em diferentes méis de melato (conclusão)

Compostos investigados	Compostos detectados	Técnica analítica / Preparo de amostra	Referência bibliográfica
Ácido quínico, ácido shikímico, floroglucinol, ácido gálico, ácido homogentísico, ácido protocatecuico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido gentísico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido clorogênico, ácido mandélico, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido 4-hidroxifenilpropiónico, 4-metilpirocatecol, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido β -fenilático, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido acetilsalicílico, ácido fenilacético, ácido elágico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido <i>p</i> -anísico, miricetina, ácido hidrocinâmico, ácido abcíscico, quercetina, ácido cinâmico, ácido 4-metoxicinâmico, kaempferol, apigenina, crisina	Todos os compostos pesquisados, com exceção do ácido shikímico, ácido sinápico, ácido acetilsalicílico e miricetina	UPLC-MS / Extração líquido-líquido	Trautvetter, Koelling-Speer, Speer (2009)
Metil siringato, ácido cinâmico, pinobanksin, pinocembrin, crisina, galangina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido 4-hidroxicinâmico, ácido benzoico, ácido cinâmico	Todos os compostos pesquisados	HPLC-UV-Vis / Extração em fase sólida e líquido-líquido	Weston, Brocklebank, Lu (2000)

Legenda: HPLC (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*); GC (do inglês *Gas Chromatography*); UPLC (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*); MS (do inglês *Mass Spectrometry*); DAD (do inglês *Diode Array Detector*); UV-Vis (ultravioleta e visível).

Fonte: Próprio autor (2015).

De acordo com a Tabela 1.3, observa-se que uma ampla variedade de compostos fenólicos já foram pesquisados em méis de melato, sendo apenas os trabalhos de Jerkovic e Marijanovic (2010) e Trautvetter, Koelling-Speer, Speer (2009) realizados de forma qualitativa. Dentre os compostos fenólicos apresentados, pode-se destacar os compostos: ácido gálico, ácido clorogênico, galangina, ácido cafeico, ácido protocatecuico, kaempferol, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico, crisina, epcatequina, pinocembrin, naringenina, ácido ferúlico, quercetina, ácido siríngico, miricetina, metil siringato, apigenina, catequina, ácido cinâmico como os mais pesquisados e encontrados nesta classe de mel. Nota-se também, que para alguns trabalhos, a presença de compostos, normalmente encontrados em méis de melato, não foi observada, como no caso do ácido clorogênico citado

por Can et al. (2015), da galangina e crisina relatados por Socha et al. (2011) e do kaempferol destacado por Can et al. (2015) e Haroun et al. (2012). Ainda, os resultados observados nos estudos de Can et al. (2015), entre diferentes méis de melato, e Socha et al. (2011), entre mel de melato em comparação a méis florais, sugerem que o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante do mel de melato parecem ser influenciados amplamente pelo perfil e quantidade de cada composto fenólico analisado.

Assim, a presença desses compostos vem sendo muito explorada nos estudos científicos, como na relação destes com a atividade antioxidante apresentada por méis (BERETTA et al., 2005; BERTONCELJ et al., 2007; PÉREZ et al., 2007).

6 Atividade antioxidante em méis

Evidências científicas indicam que o estresse oxidativo pode contribuir para a ocorrência de algumas doenças crônicas e degenerativas (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; VELA; LORENZO; PÉREZ, 2007), tais como hipertensão, câncer, mal de Alzheimer, portanto, uma dieta rica em compostos antioxidantes é considerada de grande importância como forma de prevenir, retardar ou remover os danos oxidativos (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012).

O desequilíbrio entre compostos antioxidantes e oxidantes, também formados naturalmente em organismos aeróbios, em prol dos compostos oxidantes, ocasiona o estresse oxidativo, que é visto como um fator potencialmente danoso (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; LOBO et al., 2010; VELA; LORENZO; PÉREZ, 2007). Espécies oxidantes também chamados de radicais livres, podem doar ou aceitar elétrons de outras moléculas pois são espécies moleculares contendo elétrons não pareados, o qual, geralmente os torna instáveis e altamente reativos (LOBO et al., 2010). No organismo, os radicais livres mais relacionados à doenças são espécies reativas de oxigênio, que incluem a hidroxila ($\cdot\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e espécies reativas de nitrogênio, que incluem dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^{\cdot-}$) e peroxinitrito ($\text{OONO}^{\cdot-}$), os quais podem causar danos moleculares que impactam nas funções fisiológicas (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012).

A neutralização de radicais livres ocorre através da doação de elétrons por agentes antioxidantes, os quais estabiliza a espécie oxidante sem desestabilizar o composto antioxidante, mesmo tendo sofrido a

perda de um elétron (LOBO et al., 2010). Esta característica apresentada por agentes antioxidantes se deve a presença de ao menos um anel aromático contendo ao menos um grupo hidroxila em sua estrutura química (SOCHA et al., 2011). Os antioxidantes presentes no organismo podem ser endógenos, com ou sem ação enzimática, ou exógenos administrados através da dieta por exemplo (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; KHALIL; SULAIMAN; BOUKRRA, 2010; LOBO et al., 2010).

A atividade ou capacidade antioxidante de um mel pode ser definida como a habilidade de determinadas substâncias em minimizar reações de oxidação em alimentos (como oxidação lipídica, escurecimento enzimático) e no sistema fisiológico humano (contribuindo no tratamento/prevenção de doenças crônicas) (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; KHALIL; SULAIMAN; BOUKRRA, 2010; LACHMAN et al., 2010b; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009).

Vários estudos têm indicado que méis exibem propriedades antioxidantes consideráveis atribuídas fortemente a presença de compostos fenólicos (BERTONCELJ et al., 2007; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; HUSSEIN et al., 2013; KHALIL et al., 2012). Porém, sabe-se que outros compostos também contribuem na capacidade antioxidante apresentada por méis e podem atuar inclusive em sinergismo (BERETTA et al., 2005) como enzimas, aminoácidos, minerais e demais compostos (AL et al., 2009; KHALIL; SULAIMAN; BOUKRRA, 2010; MEDA et al., 2005; O'SULLIVAN et al., 2013). Além disso, percebe-se uma grande variabilidade na composição (PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009) e consequentemente na capacidade antioxidante em méis dependendo da sua fonte botânica, geográfica, condições ambientais e de armazenagem (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; A-RAHAMAN et al., 2013; BERTONCELJ et al., 2007; KHALIL et al., 2012; MANYI-LOH; CLARKE; NDIP, 2011).

Existem diversos métodos *in vitro* que podem ser aplicados na determinação da capacidade antioxidante de alimentos e amostras biológicas, porém ainda não existe um método “universal” que possa ser empregado com consenso a qualquer tipo de amostra (KHALIL et al., 2012), incluindo o mel (CHUA et al., 2013; MAURYA et al., 2014), principalmente devido às peculiaridades pertinentes a cada uma. Desta forma, para amostras de mel, a combinação de resultados baseados em diferentes mecanismos é importante para avaliar com maior abrangência a respeito das propriedades antioxidantes (BERTONCELJ et al., 2007).

Diferentes métodos baseados em princípios e condições experimentais distintas para a determinação da capacidade antioxidante em méis podem ser empregados (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; A-RAHAMAN et al., 2013; KHALIL et al., 2012; MEDA et al., 2005), incluindo o método de desativação de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), o poder antioxidante redutor do ferro (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*), a capacidade de inativação do radical oxigênio (ORAC, do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; VELA; LORENZO; PÉREZ, 2007) e atividade antioxidante equivalente em Trolox (TEAC, do inglês *Trolox Equivalente Antioxidant Activity*) (GIORGIANA et al., 2008; MAURYA et al., 2014). Entretanto, modificações nos métodos são geralmente realizadas por pesquisadores o que pode dificultar a comparação dos resultados (BERTONCELJ et al., 2007; MAURYA et al., 2014). Desta forma, o uso de diferentes métodos de avaliação da capacidade antioxidante associado à ferramentas de uso em estatística para fins de comparação podem contribuir para o conhecimento e comparação entre a capacidade antioxidante de méis de diferentes fontes (GIORGIANA et al., 2008; MAURYA et al., 2014).

Em trabalhos publicados na literatura nota-se uma ampla utilização dos métodos FRAP e de desativação de radicais livres DPPH para a determinação da capacidade antioxidante em amostras de méis (BERETTA et al., 2005; BERTONCELJ et al., 2011; CHUA et al., 2013; KHALIL et al., 2012; O'SULLIVAN et al., 2013).

O método de desativação de radicais livres DPPH é um método espectrofotométrico utilizado em diversos tipos de alimentos na determinação da capacidade antioxidante (KHALIL et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2008; MEDA et al., 2005). Este método permite investigar de maneira global a atividade de transferência de elétron/átomo de hidrogênio de compostos individuais ou em amostras complexas (BERETTA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2008) não sendo, portanto, específico a um tipo de antioxidante (MEDA et al., 2005). Porém, geralmente moléculas pequenas, que possuem elevada atividade antioxidante, apresentam um melhor acesso ao radical DPPH (MAGALHÃES et al., 2008). Neste método, os radicais DPPH cromóforos podem reagir diretamente com compostos antioxidantes (KHALIL et al., 2012). O radical DPPH é um radical orgânico nitrogenado estável (KHALIL et al., 2012; MAURYA et al., 2014) de coloração púrpura, que quando em contato com antioxidantes ou agentes redutores, sofre reação de redução (MAGALHÃES et al., 2008).

formando a hidrazina (N_2H_4) (FLORES; ESCUREDO; SEIJO, 2015) através da doação de um elétron promovido pelo antioxidante/agente redutor, o que resulta no decréscimo da absorbância da solução (KHALIL et al., 2012; MAURYA et al., 2014), medida em comprimento de onda entre 515-528 nm (MAGALHÃES et al., 2008). Como limitações do método, sabe-se que este sofre grande influência do solvente e pH do meio. Ainda, a presença de compostos que absorvem no comprimento de onda utilizado, além da própria turbidez da amostra são fatores que devem ser contornados. Além disso, muitos antioxidantes, que reagem de forma rápida com radicais peroxil, podem não reagir ou reagir de forma lenta com os radicais DPPH (MAURYA et al., 2014), bem como a ausência do radical DPPH ou similares no sistema biológico pode ser um ponto questionável (MAGALHÃES et al., 2008).

O método FRAP também é um método espectrofotométrico utilizado na avaliação da capacidade antioxidante em diversos alimentos (MAGALHÃES et al., 2008; MAURYA et al., 2014), o qual é embasado na avaliação da capacidade redutora total da amostra. Além de compostos antioxidantes, outros compostos com características redutoras podem atuar na redução do ferro (Fe) na forma de Fe^{+3} a Fe^{+2} (BERETTA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2008), como por exemplo alguns açúcares no caso do mel (CHUA et al., 2013). Como uma limitação deste método, carotenoides e tióis em particular não são determinados devido as suas características de atuação diferenciada (MAGALHÃES et al., 2008).

Na Tabela 1.4 são apresentados estudos relacionados a capacidade antioxidante pelos métodos FRAP e de desativação de radicais DPPH em méis de melato e méis florais.

Tabela 1.4 - Estudos da capacidade antioxidante *in vitro* determinada pelo método DPPH e FRAP em méis florais e de melato (continua)

Atividade antioxidante pelo método FRAP		Atividade antioxidante pelo método DPPH				Referência bibliográfica
μmol Fe ⁺² *		IC ₅₀ **		% RSA ***		
Mel de melato	Mel floral	Mel de melato	Mel floral	Mel de melato	Mel floral	
-	-	-	-	40,7- 64,8	35,8-49,2	Al et al. (2009)
-	-	90,8	72,7-77,4	-	-	A-Rahaman et al. (2013)
772,0	72,8-1501	8,5	1,6-47,6	-	-	Beretta et al. (2005)
395,3-478,5	71,0-360,1	7,2-8,2	10,0-53,8	-	-	Bertoncelj et al. (2007)

Tab	383,7-459,4	69,6-370,2	8,2-9,0	11,6-56,8	-	-	Bertoncelj et al. (2011)
ela	-	-	12,6-76,2	20,0-152,4	-	-	Can et al. (2015)
1.4	-	-	8,6	9,5-17,8	65,4	25,0-53,5	Escuredo et al. (2013)
-	-	-	-	-	52,9-95,6	-	Flores, Escuredo e Seijo (2015)
Estu	-	-	-	-	86,9	23,9-68,5	Kowalshi (2013)
dos	-	-	-	-	64,4	34,4	Lorente, Carretero e Martín (2008)
da	-	-	-	-	-	-	
cap	-	-	-	-	-	-	
acid	-	-	-	-	-	-	
ade	-	-	-	-	-	-	

antioxidante *in vitro* determinada pelo método DPPH e FRAP em méis florais e de melato (conclusão)

Atividade antioxidante pelo método FRAP		Atividade antioxidante pelo método DPPH				Referência bibliográfica
μmol Fe ⁺² *		IC ₅₀ **		% RSA ***		
Mel de melato	Mel floral	Mel de melato	Mel floral	Mel de melato	Mel floral	
-	-	4,4-428,8	1,6-358,3	-	-	Maurya et al. (2014)
-	-	4,4-4,9	1,4-29,1	-	-	Meda et al. (2005)
-	-	-	-	47,8-63,0	-	Otilia et al. (2008)
-	-	-	-	70,0	20,7 /41,1 (blend)	Pérez et al. (2007)
-	-	-	-	20,7	18,2-46,4 / 34,6 (blend)	Socha et al. (2011)
-	-	-	-	66,8	28,7	Vela, Lorenzo e Pérez (2007)
-	-	-	-	72,5-83,5	25,6-100 / 23,8 (blend)	Wilczyńska (2010)

Legenda: - (não analisado); * em solução de mel a 10 %; ** IC₅₀ (concentração em mg mL⁻¹ de mel necessária para desativar 50 % dos radicais DPPH); *** % RSA (do inglês *Radical Scavenging Activity*).

Fonte: Próprio autor (2015).

Nota-se na Tabela 1.4 uma grande variação dos resultados em ambos os métodos de avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* em méis de melato e florais. Em relação ao método FRAP, uma ampla faixa de resultados é observada para méis florais em solução de mel a 10 %, variando de 69,6 a 1501 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$, enquanto que para mel de melato valores intermediários foram encontrados, variando de 383,7 a 772,0 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$. Na avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH expressos como IC₅₀ (concentração em mg mL⁻¹ de mel requerida para desativar 50 % dos radicais DPPH) os valores para méis florais variaram

de 1,4 a 358,3 mg mL⁻¹, valores próximos aos relatados para mel de melato (4,4 – 428,8 mg mL⁻¹). Bertoncelj et al. (2007), Bertoncelj et al. (2011) e Escuredo et al. (2013) encontraram valores inferiores para o mel de melato em relação ao mel floral, indicando que os méis de melato investigados apresentam uma capacidade antioxidante superior aos méis florais analisados nos estudos citados. Valores próximos também foram observados para o método DPPH expressos como % RSA (do inglês *Radical Scavenging Activity*) quando comparado o mel de melato (20,7 – 95,6 % RSA) e o mel floral (18,2 – 100 % RSA). Apenas os estudos de Berreta et al. (2005), Bertoncelj et al. (2007) e Bertoncelj et al. (2011) avaliaram a capacidade antioxidante de méis florais e de melato pelos dois métodos. Observa-se que o mel de melato apresenta altos valores quando comparado ao mel floral pelo método FRAP, indicando uma elevada capacidade antioxidante deste tipo de mel. Esta mesma tendência foi verificada para a capacidade antioxidante determinada pelo método DPPH. Assim, no caso destes estudos, mesmo com mecanismos reacionais distintos, ambos os métodos de avaliação da capacidade antioxidante forneceram resultados com tendências semelhantes.

Na Tabela 1.5, são apresentados outros estudos relacionados a capacidade antioxidante expressos de diferentes formas em méis de melato e florais.

Tabela 1.5 - Estudos da capacidade antioxidante *in vitro* determinada pelo método DPPH e FRAP em méis florais e de melato expressos de diferentes formas

Atividade antioxidante pelo método FRAP		Atividade antioxidante pelo método DPPH		Referência bibliográfica
Mel de melato	Mel floral	Mel de melato	Mel floral	
86 - 148 °	64 - 430 °	-	-	Can et al. (2015)
480 - 1610 °	-	-	-	Jerkovic e Marijanovic (2010)
69,9 - 88,7**	22,2 - 67,8**	37,6 - 44,2**	9,9 - 35,8**	Lachman et al. (2010b)
699 - 887 °°	13,3 - 1501 °°	-	-	Maurya et al. (2014)
-	-	0,6 - 1,1*	0,3 - 2,7* / 0,3 - 1,5* (blend)	Giorgiana et al. (2008)
-	-	24,8 - 32,4** / 12,5 - 13,9***	10,2 - 65,9** / 4,3 - 33,3***	Meda et al. (2005)
1260 °	320 °	0,3*	0,06*	Tuberoso et al. (2011)

Legenda: ° μmol Fe⁺² 100 g⁻¹; °° μmol Fe⁺² em concentração de mel desconhecida; * mmol ET (equivalente a Trolox) 100 g⁻¹; ** mg EAA (equivalente a ácido ascórbico) 100 g⁻¹; *** mg EQ (equivalente a quercetina) 100 g⁻¹; - (não analisado).

Fonte: Próprio autor (2015).

Conforme apresentado na Tabela 1.5, observa-se uma ampla gama de formas para expressar os resultados da capacidade antioxidante tanto para o método FRAP como para o método DPPH. Em relação ao método FRAP, Jerkovic e Marijanovic (2010) e Tuberose et al. (2011) encontraram para mel de melato expresso em $\mu\text{mol Fe}^{+2} 100 \text{ g}^{-1}$ valores superiores aos citados por Can et al. (2015) tanto para mel de melato como para mel floral. Na avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH expresso em mg EAA (equivalente a ácido ascórbico), Lachman et al. (2010b) também observaram valores superiores para mel de melato comparativamente ao mel floral, enquanto que Meda et al. (2005) relatam valores intermediários para o mel de melato em comparação ao mel floral.

As consequências benéficas relacionadas à ingestão de substâncias bioativas, em especial os compostos fenólicos, tem constituído um desafio ao longo dos últimos anos, e neste contexto o termo bioacessibilidade vem sendo explorado em diversas pesquisas que tem como principal objetivo determinar a potencialidade de absorção de diversos compostos pelo organismo (ALMINGER et al., 2014; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

7 Bioacessibilidade e biodisponibilidade em matrizes alimentares

A bioacessibilidade pode ser definida como a quantidade de nutrientes ingeridos através da dieta e que são liberados dessa matriz sob certas condições gastrointestinais, estando potencialmente disponíveis para absorção (ALMINGER et al., 2014; BOUAYED; BOHN, 2012; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014), ou seja, consistem na fração solubilizada no intestino delgado (BOUAYED; BOHN, 2012; HELAL et al., 2014). Assim, esse processo é dependente do processo de digestão (composição química de fluidos digestivos, pH, períodos de tempo de residência típico para cada etapa) e da liberação a partir da matriz alimentar (concentração inicial no alimento, composição da matriz) (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012; HELAL et al., 2014), tanto em condições *in vivo* como *in vitro* (HELAL et al., 2014).

A biodisponibilidade consiste na fração de compostos na sua forma original ou metabolizada que é absorvida pelo trato gastrointestinal se tornando disponível para utilização por órgãos e tecidos alvos visando exercer determinadas funções (ALMINGER et al., 2014; CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; HELAL et al., 2014; SERRANO et al., 2014). Sendo assim, a biodisponibilidade depende da

bioacessibilidade do composto e da sua capacidade de atravessar a mucosa intestinal (HELAL et al., 2014; SERRANO et al., 2014). Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique (2008) destacam ainda que normalmente apenas uma fração dos compostos é transformada numa forma biologicamente disponível e posteriormente absorvida.

Ensaio *in vivo* de bioacessibilidade e biodisponibilidade são muitas vezes de alto custo, trabalhosos e demorados, onde certos parâmetros, como pH, temperatura, concentração enzimática, muitas vezes não podem ser padronizados, assim, métodos *in vitro* se tornam uma interessante alternativa (ALMINGER et al., 2014; MÁRQUEZ et al., 2013; NAVARRO-ALARCON; CABRERA-VIQUE, 2008) visando a obtenção de informações sobre possíveis interações entre nutrientes e outros componentes do alimento, efeitos de fatores luminiais (incluindo pH e enzimas), entre outros, na absorção de qualquer nutriente (biodisponibilidade) ou na sua potencialidade de ser absorvido (bioacessibilidade) (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012). Porém, como limitações dos procedimentos *in vitro*, dificilmente será possível a simulação integral de todo o sistema gastrointestinal, o qual afeta diretamente a avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade na sua totalidade devido a complexidade das reações e mecanismos envolvidos em ensaios *in vivo* tais como condições fisiológicas individuais (idade, genótipo, estado nutricional, quantidade de secreção gástrica e intestinal, tipo de microflora bactéria intestinal), liberação do composto da matriz, grau de liberação, interações com outros composto, que são difíceis de serem reproduzidos *in vitro* (BOUAYED; BOHN, 2012; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012). Assim, em certos casos, pode haver uma baixa correlação com resultados *in vivo* (MÁRQUEZ et al., 2013), o que ressalta o fato de que estudos *in vitro* não podem substituir os estudos *in vivo*, devendo ser considerados, portanto, como uma ferramenta de classificação ou categorização, fornecendo uma estimativa da bioacessibilidade e biodisponibilidade que poderia ser observado em estudos *in vivo* (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012; HELAL et al., 2014).

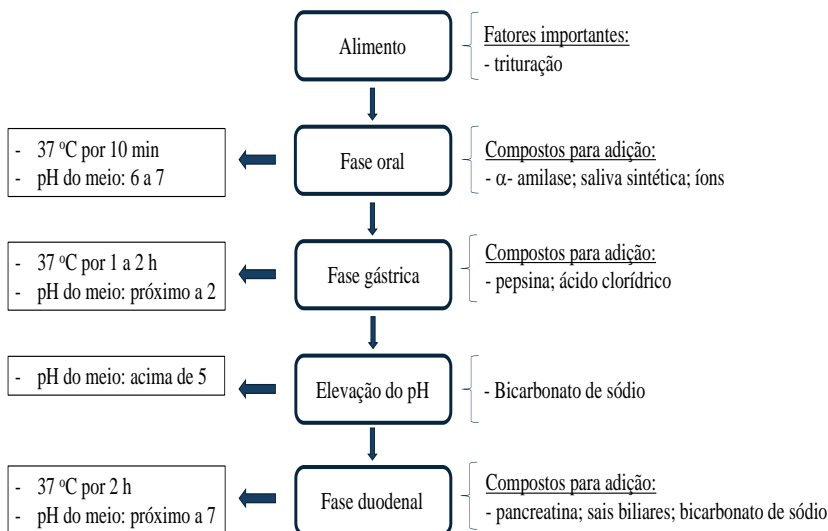
7.1 Sistema gastrointestinal *in vitro* e fatores de interação

Como as condições *in vivo* não podem ser completamente reproduzidas em métodos *in vitro* (HUR et al., 2011), estes são conduzidos sempre buscando simular o mais próximo possível do sistema digestivo humano ou animal (ALMINGER et al., 2014).

No caso da bioacessibilidade *in vitro*, Etcheverry, Grusak e Fleige (2012) citaram três métodos mais comumente utilizados: a solubilidade, a dialisabilidade e o modelo gastrointestinal, sendo que esta última técnica permite ainda mensurar a biodisponibilidade dos compostos avaliados. Ainda, o modelo de simulação da digestão pode ser estático (concentrações e volumes pré-fixados) ou dinâmico (concentração e/ou volumes sofrem mudanças ao longo da digestão) (ALMINGER et al., 2014). Pode-se considerar que o método de solubilidade é o mais empregado, onde a fração solúvel obtida após a digestão é calculada como a quantidade de composto solúvel em relação a quantidade total do composto (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012), sendo o modelo estático o mais empregado (ALMINGER et al., 2014).

Como exemplificado na Figura 1.4, em muitos estudos *in vitro* com vários tipos de alimentos, na fase gástrica, a pepsina é adicionada à amostra em pH próximo a 2. Após a digestão gástrica por determinado tempo, que varia geralmente de 1 a 2 h a 37 °C, existe a elevação do pH das amostras a um valor maior que 5, para posterior adição da pancreatina (conjunto de enzimas pancreáticas, como α -amilase, lipase, ribonuclease, tripsina entre outras) e sais biliares. O sistema então permanece por normalmente 2 h a 37 °C em condição de pH ajustado para aproximadamente 7 a fim de simular a digestão no intestino delgado, em especial no duodeno (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012). Em alguns casos, executa-se ainda a fase oral previamente as etapas gástrica e duodenal. Nesta fase, primeiramente a α -amilase salivar é adicionada a amostra permanecendo este sistema por aproximadamente 10 min a 37 °C em pH próximo a neutralidade. Ainda, outras substâncias como íons podem ser adicionadas nesta etapa (ALMINGER et al., 2014).

Figura 1.4 – Procedimento generalizado de bioacessibilidade *in vitro*



Fonte: Adaptado de Alminger et al. (2014) e Etcheverry, Grusak e Fleige (2012).

7.2 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos

O efeito da digestão gástrica sobre diferentes classes de compostos fenólicos é diferenciada, o qual parece ser dependente das condições de digestão e tempo (ALMINGER et al., 2014), apesar de alguns estudos sugerirem que compostos fenólicos normalmente são estáveis em condições gástricas (HELAL et al., 2014), inclusive alguns compostos fenólicos glicosilados (COZZOLINO, 2009; MARTÍNEZ; ROSADO, 2005). No caso da digestão duodenal, a bioacessibilidade e estabilidade dos compostos fenólicos apresenta grande dependência do pH do meio. Na presença de oxigênio e pH próximo a neutralidade, alguns compostos podem sofrer oxidação não enzimática (ALMINGER et al., 2014). A classe de compostos mais relatada como sensível às condições de digestão duodenal são as antocianinas (ALMINGER et al., 2014; HELAL et al., 2014), sendo conveniente a acidificação da amostra pós digestão duodenal, para a avaliação da taxa de degradação ou transformação destes compostos. Algumas classes de compostos como flavononas podem precipitar durante a digestão duodenal, entretanto são relatadas altas taxas de recuperação para flavononas e glicosídeos de

isoflavonas (ALMINGER et al., 2014). Porém, a eficiência antioxidante e bioacessibilidade de compostos fenólicos podem ser afetadas quando interações com proteínas (SWIECA et al., 2013), enzimas digestivas, além de outros constituintes da matriz alimentar ocorrem (HELAL et al., 2014). Assim, a ação enzimática durante a etapa duodenal pode liberar compostos fenólicos da matriz alimentar, assim como na etapa gástrica (ALMINGER et al., 2014; HELAL et al., 2014). Entretanto, dados suportam a ideia da ação inibidora de compostos fenólicos sobre enzimas pancreáticas (HE; LV; YAO, 2006), apesar de alguns estudos sugerirem o aumento da ação enzimática na presença de alguns compostos fenólicos (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

Considera-se que a biodisponibilidade de compostos fenólicos é variável, onde a sua estrutura química é determinante no grau de absorção intestinal e também nos metabolitos gerados. Sabe-se que moléculas menores como alguns ácidos fenólicos e alguns flavonoides (COZZOLINO, 2009), como isoflavonas, catequinas, quercetinas glicosiladas, flavonas, são facilmente absorvidas pelo intestino (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014), em especial as formas agliconas (forma livre de açúcares) que podem ser diretamente absorvidas no intestino delgado. Porém, fenólicos encontrados na dieta encontram-se em muitos casos na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros, não permitindo a sua absorção de forma direta (COZZOLINO, 2009; MANACH et al., 2004), como flavonoides de alta massa molecular, podendo serem considerados como pouco ativos biologicamente. Assim, enzimas digestivas além da microflora intestinal são de extrema importância na hidrólise ou metabolização desses compostos em formas mais facilmente absorvíveis (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014), sem, no entanto, garantir que estes compostos gerados apresentem elevada atividade biológica em comparação a sua forma nativa (COZZOLINO, 2009). Em adição, alguns fenólicos glicosilados parecem ser resistentes a hidrólise ácida no estômago, chegando intactos ao intestino delgado onde apenas as agliconas e alguns fenólicos específicos são absorvidos sendo os demais fenólicos metabolizados pela microflora intestinal (MARTÍNEZ; ROSADO, 2005). Geralmente, durante o processo de absorção, os compostos fenólicos sofrem metilação, sulfatação entre outros, facilitando a sua excreção pelo corpo (MANACH et al., 2004; MARTÍNEZ; ROSADO, 2005). Ainda, quando excretados no intestino delgado, esses derivados conjugados podem sofrer ação das bactérias do intestino grosso e serem novamente reabsorvidas (COZZOLINO, 2009). Os mecanismos de absorção intestinal de compostos fenólicos não são claramente

conhecidos, porém grande parte dos compostos que são absorvidos parecem apresentar característica hidrofílica o qual permite o seu transporte por difusão passiva, mas também transportadores de membrana podem estar envolvidos (MANACH et al., 2004). Além disso, a composição do alimento, como fibras, presença de álcool, entre outros, parece influenciar notoriamente na biodisponibilidade dos compostos fenólicos, desta forma mais estudos necessitam ser realizados para possibilitar afirmações conclusivas (COZZOLINO, 2009).

7.3 Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade em méis

A bioacessibilidade e disponibilidade dos elementos minoritários no mel está associada às propriedades físico-químicas desses elementos na matriz alimentar após sofrerem possíveis modificações durante o processo digestivo (POHL et al., 2012a; 2012b), além das interferências de outros componentes da matriz alimentar (POHL et al., 2012a). Assim, em concordância com Pohl et al. (2012a), observa-se que o número de trabalhos avaliando a bioacessibilidade e biodisponibilidade de elementos presentes no mel é limitada. Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade em mel são voltados basicamente para compostos fenólicos e minerais (GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2003; SERGIEL; POHL, 2010; UTHURRY; HEVIA; GOMEZ-CORDOVES, 2011).

Em relação a estudos sobre a bioacessibilidade *in vitro* em méis de diferentes fontes, foram encontrados apenas três estudos até o presente momento, compreendendo a avaliação de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e efeito protetor do DNA (O'SULLIVAN et al., 2013), de minerais cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e zinco (POHL et al., 2012a) e de metilglioxal (DAGLIA et al., 2013). O'Sullivan et al. (2013) observaram a não existência de diferenças significativas para o teor de fenólicos totais antes e após a digestão *in vitro*, porém na avaliação da atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH, um decréscimo foi observado após a digestão *in vitro*.

Gheldof, Wang e Engeseth (2003) citam que grandes variações na biodisponibilidade foram observadas dependendo da estrutura química dos flavonóides em méis de diferentes origens, onde os autores destacam que pouco se sabe sobre a absorção de ácidos fenólicos e flavonóides específicos do mel e de outros produtos apícolas. Porém, Alvarez-Suarez, Giampieri e Battino (2013) destacam que recentes estudos em humanos tem indicado que compostos fenólicos com ação antioxidante presentes no mel são biodisponíveis. Os autores citam que

já se conhece que as agliconas dos compostos fenólicos são melhor absorvidas através da parede intestinal do que os seus glicosídeos correspondentes por difusão passiva, o que torna os flavonóides do mel possivelmente mais biodisponíveis, apesar do processo ser mais complexo devido as suas características químicas. Além disso, alguns flavonóides glicosilados podem ser mais resistentes à ação enzimática não sendo por consequência absorvidos no intestino delgado, passando pelo colón e sendo excretados nas fezes.

Desta forma, apesar da contribuição do mel na recomendação diária de elementos traços e minoritários ser baixa, a importância do mel está nos feitos fisiológicos gerados por estes compostos, como os compostos fenólicos, o qual está intimamente ligado com a fonte botânica (BOGDANOV et al., 2008), sendo estes compostos essenciais na regulação de atividades biológicas já conhecidas ou não, como a manutenção do balanço intracelular oxidativo (ALVAREZ-SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO, 2013). Portanto, a avaliação da ação da digestão *in vitro* sobre, em especial, os compostos fenólicos buscando verificar a potencial disponibilidade destes para posterior absorção é importante (GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2003).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para determinação de compostos fenólicos utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem*, bem como avaliar a bioacessibilidade *in vitro* destes compostos e capacidade antioxidante em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) do planalto catarinense.

Objetivos específicos

- Desenvolver um método analítico para a determinação de compostos fenólicos utilizando LC-ESI-MS/MS (do inglês *Liquid Chromatography- Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry*);
- Validar o método desenvolvido em relação aos parâmetros de validação: faixa de trabalho e linearidade, efeito de matriz, precisão, exatidão, seletividade, limite de detecção e quantificação e robustez;

- Aplicar o método proposto na análise de compostos fenólicos em amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) do planalto catarinense;

- Realizar a digestão *in vitro*, contemplando as etapas gástrica e duodenal, em três misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham);

- Determinar o teor de compostos fenólicos totais utilizando o método de Folin-Ciocalteu antes e ao longo do processo de digestão *in vitro* em três misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham);

- Avaliar a bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos em três misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) antes e ao longo do processo de simulação da digestão utilizando LC-ESI-MS/MS;

- Determinar a capacidade antioxidante *in vitro* pelos métodos espectrofotométricos FRAP e DPPH em três misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) antes e ao longo do processo de simulação da digestão.

CAPÍTULO 2 - Validação de método para determinação de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*

1 INTRODUÇÃO

O mel é considerado uma matriz complexa (CAMPOS et al., 2003; MARENDIA et al., 2011) composta por centenas de constituintes (AL et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010) provenientes da matéria-prima (néctar, pólen ou melato), introduzidos pelas abelhas ou ainda formados ao longo do processo de maturação (KAROUI et al., 2007; MARENDIA et al., 2011; MARIANO-DA-SILVA; MARIANO-DA-SILVA; COSTA-NETTO, 2011). Vários destes constituintes vem sendo amplamente estudados e relacionados com possíveis benefícios à saúde promovidos pelo consumo do mel (AL et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; KHALIL; SULAIMAN; BOUKRRA, 2010), com destaque para a atividade antioxidante, uma das propriedades mais pesquisadas em méis (BUENO-COSTA et al., 2015; ESCUREDO et al., 2013; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). Neste contexto, a atividade antioxidante em méis é diretamente relacionada a presença de compostos fenólicos (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; BERTONCELJ et al., 2007; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; HUSSEIN et al., 2013; KHALIL et al., 2012; MANYI-LOH; CLARKE; NDIP, 2011) principalmente ácidos fenólicos e flavonoides (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; MANYI-LOH; CLARKE; NDIP, 2011).

Atualmente, o estado de Santa Catarina é um dos maiores produtores nacionais de mel (IBGE, 2013) e nos últimos anos vem se destacando também na produção de mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth), produto atualmente em crescente valorização principalmente no mercado externo (CAMPOS et al., 2003; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Este mel é produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do exsudado adocicado liberado por insetos denominados cochonilhas (gênero *Tachardiella*) que se associa à bracinga, em períodos de florada escassa (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014; MOREIRA et al., 2011; ORTH; MARTINS, 2003). A produção desse mel geralmente ocorre em maior concentração no período do outono (CAMPOS et al., 2003; MARIANO-DA-SILVA; MARIANO-DA-SILVA) e apresenta um padrão bianual regulado pelo ciclo de vida das cochonilhas (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014; WITTER et al., 2010).

Devido as baixas concentrações de compostos fenólicos em méis, geralmente o emprego de técnicas de limpeza da amostra e concentração dos analitos de interesse são necessárias (PETRUS; SCHWARTZ;

SONTAG, 2011). Ainda, o uso de detectores sensíveis como o espectrômetro de massas em muitos casos é escolhido (DAHER; GÜLAÇAR, 2008; MATHUMITHA et al., 2014; TRAUTVETTER; KOELLING-SPEER; SPEER, 2009) e por apresentar também alta seletividade (PETRUS; SCHWARTZ; SONTAG, 2011). Para tanto, a validação do método analítico deve ser realizada a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2003; EURACHEM, 2014).

Neste sentido, não foram encontrados na literatura até o presente momento trabalhos com enfoque na validação de método para identificação de compostos fenólicos em méis por LC-ESI-MS/MS, além de não serem relatados na literatura estudos sobre compostos fenólicos em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para a determinação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS em amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) da região do planalto serrano do estado de Santa Catarina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) foram coletadas e fornecidas por apicultores das regiões de Urupema, Lages e Urubici, no estado de Santa Catarina- Brasil, durante a safra de 2014, de acordo com dados da Tabela 2.1, com apoio técnico do Engenheiro Agrônomo da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina de Lages, Sr. Saulo Luiz Poffo.

Os favos ou fragmentos de favos de mel foram acondicionados em sacos plásticos previamente identificados e transportados em caixas térmicas a 5 ± 2 °C ao Laboratório de Química de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), imediatamente após a sua coleta. No laboratório, as amostras foram drenadas manualmente dos favos e coletadas em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL. Em seguida, por meio de centrifugação a 2000 rpm por 10 min (Fanem, modelo 280R, São Paulo, São Paulo- Brasil) os sedimentos ainda restantes foram separados da amostra líquida e armazenados sob congelamento (-18 ± 2 °C) para as posteriores análises.

Tabela 2.1 – Informações sobre méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)

Local	Localização geográfica	Mês de coleta	Identificação do apiário	Número de amostras
Urupema	Altitude: 1342 m	04/2014	URA1	3
	Latitude: 28° 17' 38"	04/2014	URA2	
	Longitude: 49° 55' 54"	04/2014	URA3	
Lages	Altitude: 930 m	06/2014	LGA1	3
	Latitude: 27° 49' 0"	06/2014	LGA2	
	Longitude: 50° 19' 35"	06/2014	LGA3	
Urubici	Altitude: 1087 m	06/2014	UBA1	3
	Latitude: 28° 1' 39"	06/2014	UBA2	
	Longitude: 49° 36' 45"	06/2014	UBA3	

Legenda: UR, Urupema; LG, Lages; UB, Urubici; A, Apiário: 1,2,3, relaciona-se aos distintos Apiários.

Fonte: Próprio autor (2015).

2.1.1 Preparo das amostras

Para a determinação dos compostos fenólicos em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), as amostras de mel foram pesadas em triplicata ($0,3 \pm 0,01$ g de mel) em microtubos de polipropileno e adicionados $0,3 \pm 0,01$ g de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, Massachusetts, Estados Unidos). As amostras foram homogeneizadas por inversão por 4 min para haver a dissolução inicial do mel e agitadas em seguida em agitador orbital (Thermo Fischer Scientific Inc., modelo MaxQ 3000, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a 190 rpm por 20 min para completa homogeneização do mel. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 min em microcentrifuga refrigerada a 4 °C (Thermo Fischer Scientific Inc., modelo Fresco, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e o sobrenadante foi utilizado para injeção no sistema de LC-ESI-MS/MS.

Para a determinação dos compostos fenólicos, 100 µL do mel (sobrenadante) foi diluído em 900 µL de fase móvel (98 % água, 2 % acetonitrila adicionado de 0,1 % ácido fórmico) e posteriormente injetado no sistema de LC-ESI-MS/MS, sendo realizada diluições das amostras quando necessário.

2.2 Reagentes e padrões

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água ultrapura. Metanol, acetonitrila, ácido fórmico e

dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos).

Os compostos fenólicos analisados e a concentração da solução padrão de cada analito são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Compostos fenólicos pesquisados, procedência e concentração da solução padrão estoque

Composto fenólico	Procedência	Concentração da solução padrão (mg L ⁻¹)	Composto fenólico	Procedência	Concentração da solução padrão (mg L ⁻¹)
Ácido benzoico	Riedel-de Haën	1000	Ácido <i>p</i> -cumá- rico	S-A	1000
Ácido <i>p</i> -ami- nobenzoico	S-A	1000	Ácido vanílico	S-A	1000
Siringaldeído	S-A	1000	Ácido gálico	Vetec	1000
Ácido férilico	S-A	1000	4-metilumbeli- ferona	S-A	1000
Ácido siríngico	S-A	1000	Coniferaldeído	S-A	1000
Pinocembrin	S-A	1000	Ácido cafeico	S-A	1000
Galangina	S-A	1000	Sinapaldeído	S-A	1000
Apigenina	S-A	1000	Ácido sinápico	S-A	1000
Kaempferol	S-A	1000	Crisina	S-A	1000
Luteolina	S-A	1000	Naringenina	S-A	1000
Epicatequina	S-A	1000	Pinobanksin	S-A	1150
Catequina	S-A	1000	Quercetina	Fluka	1000
Ácido clorogênico	S-A	1000	Isoramnetina	S-A	1250
Hesperidina	S-A	1000	Epigallocate- quina galato	S-A	1000
Ácido salicílico	Nuclear	1000	Naringina	S-A	1000
Ácido 3,4-dihí- droxi benzoico	Acros Organic	1000	Rutina	S-A	1000

Legenda: S-A - Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos); Nuclear (Diadema, São Paulo, Brasil); Fluka (Saint Gallen, Suíça); Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil); Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha); Acros Organic (Geel, Bélgica).

Fonte: Próprio autor (2015).

As soluções padrões dos analitos isoramnetina e hesperidina foram preparadas em DMSO enquanto que para os demais analitos as soluções foram preparadas em metanol (Tabela 2.2). Todas as soluções padrões individuais foram estocadas a -18 ± 2 °C até o momento das análises. Durante as análises, semanalmente, a fim de evitar possíveis alterações e/ou degradações, foram preparadas misturas em metanol desses analitos de acordo com as concentrações exigidas para cada análise.

2.3 Instrumentação para determinação de compostos fenólicos

Os procedimentos analíticos foram realizados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Serviço Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV-SC), pertencente ao Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS) em um sistema constituído por um espectrômetro de massas do tipo triploquadropolar AB SCIEX QTRAP® 5500 System (Applied Biosystems, Concord, Califórnia, Estados Unidos) equipado com célula de colisão Qurved LINAC®, guia de íons Qjet®, fonte de ionização (tipo ESI) Turbo V™, detector AcQuRate™ e eletrônica Fast eQTM, gerador de gases PEAK Generator (PEAK Scientific Instruments, Escócia) e bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, Massachusetts, Estados Unidos). O espectrômetro de massas possui hifenização com um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) equipado com bomba binária, sistema degaseificador, amostrador automático com controle de temperatura e capacidade para 108 posições para recipientes de 2,0 mL e forno para seis colunas analíticas. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o *software* Analyst versão 1.6.2.

A separação foi conduzida em uma coluna de fase reversa C18(L) Venusil XBP (Bonna-Agela Technologies, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) de 100 mm comprimento, 2,1 mm diâmetro interno, 3 µm de tamanho da partícula e 150 Å de tamanho de poro. Para a separação cromatográfica, foi utilizado um gradiente de fase móvel constituído de água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (A) e de acetonitrila adicionado de 0,1 % de ácido fórmico (B) conforme Tabela 2.3. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C, volume de injeção de amostra de 5 µL e abertura de válvula de descarte até 1,9 min de corrida.

Tabela 2.3 – Condições do gradiente para separação cromatográfica

Tempo de corrida cromatográfica (min)	Vazão (µL min ⁻¹)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	300	98	2
4	300	98	2
7	300	80	90
14	300	10	90
15	300	10	90
17	300	98	2

Fonte: Próprio autor (2015).

A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por meio de infusão direta dos analitos em solução contendo 50 % água, 50 % acetonitrila adicionado de 0,1 % ácido fórmico, sendo

determinado o melhor modo de ionização para cada composto conforme listado na Tabela 2.4. Outros parâmetros do espectrômetro de massas foram gás de cortina de 25 psi, gás de colisão alta, voltagem de IonSpray 5500 V, temperatura de 400 °C, fonte de gás íon 1 e 2, de 55 psi, além de outros informados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Parâmetros operacionais otimizados para análise de compostos fenólicos em modo MRM positivo ou negativo

Composto fenólico	TR	Massa molar	Q1	Q3	DPo	EP	CE	CXP
Ácido salicílico	6,10	138,1	136,9*	93,10 / 64,90	-15	-10	-22 / -36	-5 / -11
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	3,18	154,1	152,9*	109,0 / 90,90	-75	-10	-20 / -32	-7 / -13
Ácido <i>p</i> -cumárico	4,99	164,2	162,9*	119,0 / 93,00	-90	-10	-20 / -40	-7 / -5
Ácido vanílico	6,38	168,1	166,9*	137,0 / 109,1	-140	-10	-12 / -16	-9 / -7
Ácido gálico	2,32	170,1	168,9*	124,9 / 79,00	-110	-10	-20 / -30	-7 / -11
4-metilumbeliferona	5,78	176,2	174,9*	133,0 / 119,1	-135	-10	-28 / -36	-9 / -7
Coniferaldeído	5,71	178,2	177,0*	134,0 / 160,8	-30	-10	-28 / -28	-9 / -11
Ácido cafeico	4,25	180,2	178,9*	135,0 / 107,0	-115	-10	-22 / -30	-9 / -7
Sinapaldeído	5,64	208,2	206,9*	177,0 / 148,9	-20	-10	-26 / -34	-11 / -9
Ácido sinápico	5,13	224,2	223,0*	163,9 / 192,9	-120	-10	-20 / -28	-9 / -11
Crisina	7,96	224,2	223,0*	142,9 / 209,1	-170	-10	-36 / -30	-9 / -11
Naringenina	6,80	272,2	271,0*	151,0 / 119,0	-130	-10	-24 / -34	-25 / -11
Pinobanksin	6,83	272,2	271,0*	150,9 / 119,5	-140	-10	-24 / -32	-9 / -7
Quercetina	6,29	302,2	301,0*	150,9 / 121,0	-50	-10	-28 / -34	-9 / -7
Isoramnetina	6,92	316,3	315,0*	300,0 / 150,9	-225	-10	-28 / -38	-15 / -9
Epigallocatequina galato	4,33	458,4	457,0*	169,0 / 125,0	-165	-10	-20 / -52	-11 / -9
Naringina	5,32	580,5	579,0*	271,0 / 151,0	-255	-10	-42 / -48	-13 / -9
Rutina	4,82	610,5	609,0*	299,9 / 270,9	-230	-10	-48 / -70	-15 / -9
Ácido benzoico	5,84	122,1	122,9	79,00 / 51,00	36	10	17 / 51	12 / 24
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	3,05	137,1	138,0	77,00 / 94,00	56	10	29 / 19	10 / 8
Siringaldeído	5,07	182,2	183,0	123,1 / 77,00	41	10	17 / 31	8 / 10
Ácido ferúlico	5,20	194,2	195,0	176,9 / 89,00	21	10	11 / 41	10 / 10
Ácido siríngico	4,30	198,2	199,0	140,0 / 155,1	16	10	21 / 13	10 / 10
Pinocembrin	8,10	256,2	257,0	153,0 / 76,90	96	10	33 / 73	10 / 10
Galangina	8,13	270,2	271,0	153,0 / 115,1	176	10	43 / 59	10 / 8
Apigenina	6,73	270,2	271,0	153,0 / 90,90	181	10	41 / 49	10 / 14
Kaempferol	6,85	286,2	286,9	153,0 / 68,90	111	10	43 / 89	10 / 10
Luteolina	6,24	286,2	286,9	153,0 / 68,90	111	10	43 / 89	10 / 10
Epicatequina	4,27	290,3	291,0	138,9 / 123,0	36	10	21 / 21	8 / 8
Catequina	3,82	290,3	291,0	139,0 / 123,0	16	10	21 / 19	10 / 8
Ácido clorogênico	3,76	354,3	355,1	163,0 / 89,00	46	10	21 / 75	10 / 14
Hesperidina	5,38	610,5	611,2	303,0 / 153,1	51	10	31 / 67	16 / 10

Legenda: MRM (do inglês *multiple reaction monitoring*); * analitos com modo de ionização negativo; TR – tempo de retenção (min); Q1 – massa molar (g mol^{-1}) do íon precursor no modo positivo ou negativo; Q3 – massa molar (g mol^{-1}) do íon de quantificação e de confirmação, respectivamente; DPo (do inglês *declustering potential*); EP (do inglês *entrance potential*); CE (do inglês *collision energy*); CXP (do inglês *collision cell exit potential*).

Fonte: Próprio autor (2015).

Os compostos fenólicos foram monitorados utilizando o monitoramento de reações múltiplas. A identificação dos compostos foi realizada com base no tempo de retenção, íon precursor, fragmento principal (íon de quantificação) e fragmento secundário (íon de confirmação) por comparação com padrões comerciais.

2.4 Validação analítica

Os parâmetros de validação avaliados consistiram da faixa de trabalho e linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A validação analítica seguiu as recomendações de órgãos nacionais e internacionais (BRASIL, 2003; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b; EURACHEM, 2014; EUROPEAN COMMISSION, 2002) e trabalhos publicados sobre o tema (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; KRUIVE et al., 2015a; KRUIVE et al., 2015b).

2.4.1 Faixa de trabalho e linearidade

Na Tabela 2.5 é apresentado o número de níveis e faixa de concentração utilizado para a construção da curva de calibração para cada analito.

Tabela 2.5 – Faixa de concentração e níveis da curva de calibração de cada analito

Composto fenólico	Faixa de concentração (µg L ⁻¹)	Níveis	Composto fenólico	Faixa de concentração (µg L ⁻¹)	Níveis
Ácido benzoico	25,0-250	10	Ácido <i>p</i> -cumárico	0,80-25,0	8
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	1,60-20,9	7	Ácido vanílico	0,40-25,0	10
Siringaldeído	1,60-20,9	7	Ácido gálico	1,60-25,0	8
Ácido ferúlico	3,20-25,0	7	4-metilumbeliferona	0,80-25,0	8
Ácido siringico	1,60-25,0	8	Coniferaldeído	1,60-25,0	8
Pinocembrin	0,40-25,0	8	Ácido cafeico	3,20-20,9	6
Galangina	1,60-25,0	8	Sinapaldeído	0,40-25,0	10
Apigenina	0,80-25,0	8	Ácido sinápico	0,80-25,0	9
Kaempferol	1,60-25,0	8	Crisina	0,80-20,9	8
Luteolina	0,40-25,0	10	Naringenina	0,20-25,0	8
Epicatequina	1,60-25,0	8	Pinobanksin	0,46-28,7	10
Catequina	1,60-25,0	8	Quercetina	0,80-25,0	9
Ácido clorogênico	0,40-25,0	10	Isoramnetina	0,50-26,1	7
Hesperidina	0,40-25,0	10	Epigallocatequina	0,80-20,9	7

Ácido salicílico	25,0-225	9	galato		
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	25,0-225	9	Naringina	0,80-20,9	8
			Rutina	0,40-25,0	10

Fonte: Próprio autor (2015).

Como mostrado na Tabela 2.5, as curvas foram construídas entre seis e dez níveis de concentração dependendo do analito e distribuídos de forma equidistante. Para a avaliação da linearidade, as curvas de calibração foram preparadas independentemente a partir de uma mistura de solução padrão em triplicata e injetadas aleatoriamente.

O Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) foi utilizado para estimar os parâmetros da curva de calibração, sendo para tanto verificado o atendimento às premissas de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Primeiramente, a partir dos dados observados experimentalmente, foi realizada a regressão linear e observado visualmente o gráfico dos resíduos da regressão para determinação de possíveis *outliers*. Após inspeção visual, caso verificado a existência de possíveis *outliers*, estes foram submetidos ao teste de Grubbs para confirmação (GRUBBS, 1969). Em seguida, os resíduos foram submetidos aos testes de: normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965); homoscedasticidade pelo teste de Levene (LEVENE, 1960), a fim de confirmar variância constante dos resíduos; independência através do teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951) objetivando verificar a não existência de correlação seriada dos resíduos; e ajuste ao modelo linear pelo teste *F* (SNEDECOR; COCHRAN, 1989).

2.4.2 Efeito de matriz

O estudo do efeito de matriz foi realizado utilizando adição de padrão na amostra UBA3 de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) por não haver uma matriz branca isenta dos analitos de interesse devido à complexidade deste tipo de mel.

A avaliação do efeito de matriz foi averiguada por meio da comparação das inclinações das curvas de solução padrão e de matriz, empregando o teste *t*. Para a aplicação do teste *t*, foi primeiramente realizado o teste *F* em que se o *F* calculado fosse menor que o *F* tabelado, não há diferenças entre as variâncias sendo indicado a aplicação do teste *t* para variâncias equivalentes, caso contrário, recomenda-se a aplicação do teste *t* para variâncias distintas. Ao ser realizado o teste *t* adequado, caso o *t* calculado seja menor que o *t*

tabelado (bicaudal), não há diferenças entre as variâncias, não havendo por consequência efeito de matriz (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

2.4.3 Seletividade

A verificação da seletividade do método foi realizada com base na Diretiva 657 (EUROPEAN COMISSION, 2002). Primeiramente, foi determinada a razão entre a área dos íons de confirmação e de quantificação para cada ponto da curva de solução padrão de cada analito e em seguida determinada a razão média. Este mesmo procedimento foi realizado para os analitos quantificados nas amostras de mel.

Para a comparação entre a razão média da curva em solução padrão e a razão média das amostras para cada analito, assumiu-se as condições apresentadas na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Razão média da curva de solução padrão e sua respectiva variação aceitável para a razão da amostra

Razão média da curva de solução padrão	Variação aceitável para razão média das amostras
> 0,50	Até ± 20%
0,50 – 0,20	Até ± 25%
0,20 – 0,10	Até ± 30%
< 0,10	Até ± 50%

Fonte: Adaptado do quadro 4 da Diretiva 657 (EUROPEAN COMISSION, 2002).

Se for verificado que a razão média de uma ou mais amostras para determinado analito não esteja inserido no intervalo definido apresentado na Tabela 2.6, o método não se mostra seletivo para aquele analito em determinada amostra, indicando a presença de possíveis interferentes.

2.4.4 Precisão

Foi realizada a determinação da repetibilidade (precisão intra-ensaio) a partir da injeção de todos os níveis de concentração das curvas de solução padrão preparadas em triplicatas pelo mesmo analista no mesmo dia em relação a área dos picos. A reprobutilidade parcial (precisão inter-ensaio) foi avaliada pela injeção das curvas de solução

padrão, em todos os seus níveis de concentração, preparadas em triplicata pelo mesmo analista três vezes ao longo de duas semanas, em relação a área dos picos.

2.4.5 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi realizada por meio da recuperação aparente da amostra UBA3 de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) fortificada em três níveis de concentração: próximos aos níveis de concentração inferior, intermediário e superior da faixa de trabalho, em seis réplicas independentes. Para os cálculos de recuperação aparente (Rec) da amostra UBA3, utilizou-se a Equação 1.

$$Rec\ (\%) = \frac{Concentração\ amostra\ fortificada - Concentração\ amostra\ não\ fortificada}{Concentração\ adicionada\ na\ fortificação} \times 100 \quad (1)$$

2.4.6 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A determinação do LD foi estabelecida como a relação mínima de três vezes a razão sinal do analito/sinal do ruído, tanto para o íon de quantificação como para o íon de confirmação, correspondendo a menor concentração do analito que pode ser detectada. O LQ foi estabelecido como a relação mínima de dez vezes à razão sinal do analito/sinal do ruído tanto para o íon de quantificação como para o íon de confirmação.

2.4.7 Robustez

Para a avaliação da robustez, foi empregado o delineamento experimental denominado teste de *Youden* (YOUTDEN; STEINER, 1975), sendo que sete parâmetros analíticos sofreram pequenas alterações e foram combinados em oito experimentos, conforme Tabela 2.7.

Tabela 2.7 – Delineamento experimental utilizando o teste de *Youden*

Parâmetros analíticos	Fatorial (número de experimentos)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ácido fórmico nas fases móveis A e B (%)	A	A	A	A	a	a	a	a
Volume de injeção (µL)	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura da coluna (°C)	C	c	C	c	C	c	C	c
Vazão (µL min ⁻¹)	D	D	d	d	d	d	D	D
Proporção água:acetonitrila fase móvel de diluição (v/v - %)	E	e	E	e	e	E	e	E

Tempo de abertura da válvula de descarte (min)	F	f	f	F	F	f	f	F
Tempo de equilíbrio da coluna (min)	G	g	g	G	g	G	G	g
Condição analítica resultante das combinações	s	t	u	v	w	x	y	z

Legenda: Letras maiúsculas indicam as condições nominais (sem alteração) dos parâmetros analíticos; Letras minúsculas indicam as condições alteradas dos parâmetros analíticos.

Fonte: Adaptado de Youden e Steiner (1975).

De acordo com as condições especificadas na Tabela 2.7, foi injetada a amostra UBA3 de mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Bentham) fortificada, em triplicata de preparo, e avaliados os resultados dos oito experimentos sobre a concentração de cada analito ($\mu\text{g L}^{-1}$) conforme exemplo apresentado na Equação 2, onde a média dos valores nominais foi subtraída da média dos valores alterados, para cada um dos sete parâmetros analíticos estudados.

$$A - a = \frac{(s+t+u+v)}{4} - \frac{(w+x+y+z)}{4} \tag{2}$$

Ainda, a fim de conhecer se as modificações promovidas geraram alterações significativas ($p < 0,05$) na concentração dos analitos, foi aplicado o teste *F* e em seguida o teste *t* mais adequado para todos os analitos e parâmetros estudados (KRUVE et al., 2015a).

Os parâmetros selecionados e suas alterações são informados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Condições nominais (sem alteração) e alteradas aplicadas na avaliação da robustez

Parâmetros analíticos	Condição nominal	Condição alterada
Acido fórmico nas fases móveis A e B (%)	0,1 (A)	0,08 (a)
Volume de injeção (μL)	5 (B)	5,5 (b)
Temperatura da coluna ($^{\circ}\text{C}$)	30 (C)	35 (c)
Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$)	0,300 (D)	0,280 (d)
Proporção água:acetonitrila da fase movel de diluição (v/v - %)	98:2 (E)	95:5 (e)
Tempo de abertura da válvula de descarte (min)	1,9 (F)	1,3 (f)
Tempo de equilíbrio da coluna (min)	4 (G)	4,5 (g)

Fonte: Próprio autor (2015).

2.5 Análise estatística

Todas as análises foram conduzidas em triplicata de preparo, com excessão da avaliação da exatidão (seis réplicas) e os resultados expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR). Para todas as análises estatísticas, o intervalo de confiança de

95% foi adotado. As análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistica 7.0* e Microsoft Excel 2010 com a extensão *Action 2.9*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização de método analítico em LC-ESI-MS/MS

As colunas de fase reversa, como C18 e C8, são amplamente empregadas em separações cromatográficas de compostos fenólicos em sistema de cromatografia líquida em diferentes matrizes alimentares (BEER; JOUBERT, 2010; BERTIN et al., 2014; LANGOS et al., 2015). Pela característica apolar das colunas de fase reversa, o uso de solventes acidificados durante a separação cromatográfica assegura que os compostos fenólicos estejam abaixo do seu pK_a apresentando-se na forma não dissociada (característica apolar) (SANTANA et al., 2009). Quando acoplado à espectrometria de massas, geralmente o uso de ácido fórmico é relatado, com concentrações próximas a 0,1 %, na acidificação dos solventes. Ainda, a utilização de acetonitrila, como solvente orgânico, e água são os solventes mais utilizados (BORGES et al., 2011; ENGSTRÖM; PÄLIJÄRVI; SALMINEN, 2015; LANGOS et al., 2015). Sempre buscando bandas cromatográficas bem resolvidas em um menor tempo de análise, a literatura traz diversos trabalhos explorando o uso de gradiente de fase móvel, temperatura da coluna normalmente próxima a 30 °C (BERTIN et al., 2014; CAO et al., 2015) e vazão geralmente entre 200 - 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ (BERTIN et al., 2014; BORGES et al., 2011; CAO et al., 2015; ENGSTRÖM; PÄLIJÄRVI; SALMINEN, 2015; LANGOS et al., 2015).

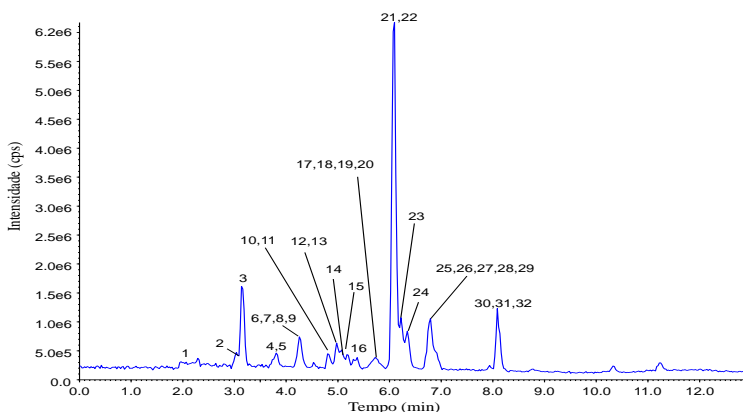
Com base nestas informações, o método proposto neste trabalho consistiu do uso de eluição por gradiente da fase móvel constituída de água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (A) e de acetonitrila adicionado de 0,1 % de ácido fórmico (B), com temperatura da coluna de 30 °C e vazão de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, além de ter sido utilizada para a separação dos compostos fenólicos uma coluna de fase reversa C18. Devido a utilização neste estudo de detector de espectrometria de massas, a ocorrência de co-eluição de analitos durante a separação cromatográfica não é necessariamente um problema, pois a seletividade do método é garantida pela seleção de fragmentos específicos gerados por cada analito (HARRIS, 2012; SKOOG; HOLLER; NIEMAN,

2002). Assim, apenas modificações no volume de injeção, tempo de abertura da válvula de descarte e gradiente de eluição foram realizados. A utilização de um volume de 10 μL não gerou melhora significativa em relação ao volume de 5 μL , sendo, portanto, este volume considerado adequado para análise de compostos fenólicos. Ainda, alterações no gradiente de eluição foram promovidas, onde modificações na proporção dos solventes A e B foram realizadas com o intuito de alcançar a melhor condição de separação associado ao menor tempo de análise, sendo selecionada, portanto, a condição de eluição de: 0 – 4 min: mantido em 98% A; 4 – 7 min: 80% A (gradiente linear); 7 – 14 min: 10% A (gradiente linear); 14 – 15 min: mantido em 10% A; 15 – 17 min: 98% A (gradiente linear). A abertura da válvula de descarte foi realizada com base no analito com menor tempo de retenção (min) na condição de separação cromatográfica otimizada, a fim de minimizar os efeitos causados pela alta concentração de açúcares das amostras, o que poderia causar supressão de sinal.

A otimização dos parâmetros operacionais do MS/MS para cada analito foi realizada de forma automática pelo equipamento e por meio de infusão direta dos analitos de interesse no sistema.

A Figura 2.1 apresenta o cromatograma de íons totais (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) de 32 compostos fenólicos em solução padrão (200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os ácidos benzóico, salicílico e 3,4-dihidroxibenzoico; 26,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para isoramnetina; 24,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para pinobanksin; e 20,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os demais analitos).

Figura 2.1 – Cromatograma de íons totais dos compostos fenólicos em solução padrão analisados nas condições cromatográficas otimizadas



Legenda: 1 – ácido gálico; 2 – ácido *p*-aminobenzoico; 3 – ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 4 – ácido clorogênico; 5 – catequina; 6 – ácido cafeico; 7 – epicatequina; 8 – ácido sirínico; 9 – epigallocatequina galato; 10 – rutina; 11 – ácido *p*-cumárico; 12 – siringaldeído; 13 – ácido sinápico; 14 – ácido ferúlico; 15 – naringina; 16 – hesperidina; 17 – sinapaldeído; 18 – coniferaldeído; 19 – 4-metilumbeliferona; 20 – ácido benzoico; 21 – ácido salicílico; 22 – luteolina; 23 – quercetina; 24 – ácido vanílico; 25 – apigenina; 26 – naringenina; 27 – pinobanksin; 28 – kaempferol; 29 – isoramnetina; 30 – crisina; 31 – pinocembrin; 32 – galangina.

Fonte: Próprio autor (2015).

Na Figura 2.1, observa-se que em um tempo menor que 9 min é possível a determinação de 32 compostos fenólicos. O TIC não apresenta visualmente picos bem resolvidos, porém, a partir da extração dos íons de quantificação e de confirmação de cada composto individualmente foram obtidos picos com uma resolução adequada (dados não mostrados).

3.2 Validação analítica

3.2.1 Faixa de trabalho e linearidade

Foi realizada a regressão linear no qual os gráficos gerados forneceram um valor de R^2 (coeficiente de determinação) maior que 0,98 para todos os analitos investigados. A partir do gráfico dos resíduos da regressão, foram identificados possíveis *outliers* para todos os analitos por meio da inspeção visual e estes foram submetidos ao teste de Grubbs para confirmação (GRUBBS, 1969). Após aplicação do teste de Grubbs, foi confirmado para os analitos siringaldeído, ácido sirínico, epicatequina, catequina, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, iroramnetina, epigallocatequina galato e naringina a presença de um *outlier*. Para os analitos ácido benzoico, kaempferol, luteolina e ácido gálico foi verificada a presença de dois *outliers*, enquanto que para o pinocembrin e apigenina três *outliers* foram determinados. Não foi confirmada a presença de *outliers* para os demais compostos. Quando a presença de *outliers* foi confirmada, estes valores foram retirados respeitando o valor máximo de exclusão de dados de 22,2% (GRUBBS, 1969).

A confirmação da normalidade dos resíduos da regressão foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk, conforme Tabela 2.9.

Tabela 2.9 – Resultados de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk para a curva de calibração da solução padrão dos analitos (continua)

Composto fenólico	<i>p</i> calculado	Resultado	Composto fenólico	<i>p</i> calculado	Resultado
----------------------	--------------------	-----------	----------------------	--------------------	-----------

Ácido benzoico	0,71313	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido <i>p</i> -cumárico	0,08415	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido <i>p</i> -amino-benzoico	0,12207	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido vanílico	0,06021	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Siringaldeído	0,65179	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido gálico	0,05437	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido ferúlico	0,06229	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	4-metilumbeliferona	0,05771	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido siríngico	0,17635	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Coniferaldeído	0,88692	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Pinocembrin	0,06580	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido cafeico	0,79445	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Galangina	0,96251	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Sinapaldeído	0,24062	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Apigenina	0,25294	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido sinápico	0,26889	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Kaempferol	0,06418	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Crisina	0,35192	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Luteolina	0,49052	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Naringenina	0,06078	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Epicatequina	0,57962	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Pinobanksin	0,06262	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Catequina	0,14976	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Quercetina	0,11869	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$

Tabela 2.9 – Resultados de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk para a curva de calibração da solução padrão dos analitos (conclusão)

Composto fenólico	p calculado	Resultado	Composto fenólico	p calculado	Resultado
Ácido clorogênico	0,07699	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Isoramnetina	0,08137	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Hesperidina	0,08092	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Epigallocatequina galato	0,06639	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido salicílico	0,14785	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Naringina	0,60687	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido 3,4-di-hidroxi-benzoico	0,90632	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Rutina	0,48212	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$

Legenda: $p \text{ cal}$ – valor de p calculado; $p \text{ tab}$ – valor de p tabelado.

Fonte: Próprio autor (2015).

Conforme apresentado na Tabela 2.9, foi confirmada a distribuição normal dos dados para todos os analitos, uma vez que o p calculado foi maior que o p tabelado (0,05),

Após confirmada a normalidade dos dados, foi verificada a homoscedasticidade dos resíduos da regressão pelo teste de Levene, como apresentado na Tabela 2.10.

Tabela 2.10 – Resultados de homoscedasticidade pelo teste de Levene para a curva de calibração da solução padrão dos analitos

Composto fenólico	p calculado	Resultado	Composto fenólico	p calculado	Resultado
Ácido benzoico	0,61497	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido <i>p</i> -cumárico	0,66113	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido <i>p</i> -amino-benzoico	0,69422	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido vanílico	0,34135	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Siringaldeído	0,67658	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido gálico	0,75431	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido ferúlico	0,57420	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	4-metilumbeliferona	0,61724	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido siríngico	0,46056	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Coniferaldeído	0,86945	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Pinocembrin	0,50464	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido cafeico	0,84656	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Galangina	0,88611	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Sinapaldeído	0,85595	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Apigenina	0,63816	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Ácido sinápico	0,48622	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Kaempferol	0,73631	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Crisina	0,82007	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Luteolina	0,30394	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Naringenina	0,83283	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Epicatequina	0,47735	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Pinobanksin	0,35952	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Catequina	0,40701	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Quercetina	0,30769	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido	0,54194	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Isoramnetina	0,59898	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$

clorogênico

Hesperidina	0,25350	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Epigallocatequina galato	0,62516	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido salicílico	0,54049	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Naringina	0,23178	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$
Ácido 3,4-dihidrobenzoico	0,59349	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$	Rutina	0,32113	$p \text{ calc} > p \text{ tab}$

Legenda: $p \text{ cal}$ – valor de p calculado; $p \text{ tab}$ – valor de p tabelado.

Fonte: Próprio autor (2015).

Todos os dados se mostraram homoscedásticos, como verificado na Tabela 2.10, visto que o p calculado foi maior que o p tabelado (0,05).

A independência dos resíduos foi verificada pelo teste de Durbin-Watson. Os valores obtidos (DW) pelo teste para os analitos seguem na Tabela 2.11.

Tabela 2.11 – Resultados de independência pelo teste de Durbin-Watson para a curva de calibração da solução padrão dos analitos

Composto fenólico	DW calculado	Resultado	Composto fenólico	DW calculado	Resultado
Ácido benzoico	2,4942	Independência	Ácido <i>p</i> -cumárico	2,0053	Independência
Ácido <i>p</i> -amino-benzoico	2,2597	Independência	Ácido vanílico	1,1448	Dependência
Siringaldeído	2,2788	Independência	Ácido gálico	1,5421	Independência
Ácido fértilico	0,6925	Dependência	4-metilumbeliferona	2,0148	Independência
Ácido siringico	2,0455	Independência	Coniferaldeído	1,5825	Independência
Pinocembrin	1,4919	Independência	Ácido cafeico	2,1491	Independência
Galangina	1,8810	Independência	Sinapaldeído	1,4897	Independência
Apigenina	1,4775	Independência	Ácido sinápico	2,4085	Independência
Kaempferol	1,8114	Independência	Crisina	2,0573	Independência
Luteolina	1,8580	Independência	Naringenina	2,0667	Independência
Epicatequina	1,9944	Independência	Pinobanksin	1,3018	Dependência
Catequina	1,6279	Independência	Quercetina	1,4664	Inconclusivo
Ácido clorogênico	2,0259	Independência	Isoramnetina	2,4591	Independência
Hesperidina	1,8173	Independência	Epigallocatequina galato	2,3476	Independência
Ácido salicílico	1,3892	Inconclusivo	Naringina	1,9776	Independência
Ácido 3,4-dihidrobenzoico	1,6221	Independência	Rutina	2,5452	Inconclusivo

Legenda: DW – valor calculado pelo teste de Durbin-Watson.

Fonte: Próprio autor (2015).

Os valores DW foram comparados com os seus respectivos valores tabelados de d_L , d_U , $4-d_U$ e $4-d_L$ e classificados conforme a condição em que se adequavam: se $0 \leq DW < d_L$, indica dependência; se $d_L \leq DW \leq d_U$, indica inconclusividade; se $d_U < DW < 4-d_U$, indica independência; se $4-d_U \leq DW \leq 4-d_L$, indica inconclusividade; se $4-d_L < DW \leq 4$, indica dependência. A ausência de autocorrelação entre os

dados foi confirmada para 26 analitos, onde apenas três compostos fenólicos apresentaram dependência e três foram classificados como inconclusivos.

Por fim, o ajuste dos dados ao modelo linear foi verificado pelo teste F de Snedecor e Cochran (1989), estando os resultados apresentados na Tabela 2.12.

Tabela 2.12 – Valores de F utilizados para verificação do ajuste ao modelo linear para a curva de calibração da solução padrão

Composto fenólico	F calculado	F tabelado	Composto fenólico	F calculado	F tabelado
Ácido benzoico	403	1,26	Ácido <i>p</i> -cumárico	2028	1,21
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	279	1,19	Ácido vanílico	1516	1,27
Siringaldeído	1276	1,18	Ácido gálico	1120	1,20
Ácido ferúlico	1342	1,19	4-metilumbeliferona	1206	1,22
Ácido siríngico	442	1,21	Coniferaldeído	1974	1,22
Pinocembrin	1119	1,16	Ácido cafeico	490	1,16
Galangina	1369	1,22	Sinapaldeído	4147	1,28
Apigenina	3022	1,19	Ácido sinápico	1380	1,25
Kaempferol	1563	1,20	Crisina	4318	1,22
Luteolina	1307	1,26	Naringenina	1235	1,22
Epicatequina	1720	1,21	Pinobanksin	4254	1,28
Catequina	587	1,21	Quercetina	669	1,25
Ácido clorogênico	2988	1,28	Isoramnetina	1191	1,18
Hesperidina	1605	1,28	Epigallocatequina galato	1148	1,18
Ácido salicílico	2785	1,25	Naringina	2973	1,21
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	2639	1,25	Rutina	2507	1,28

Fonte: Próprio autor (2015).

A falta de ajuste dos dados ao modelo linear foi rejeitada pelo teste F , como mostrado na Tabela 2.12, uma vez que o F calculado foi maior que o F tabelado.

Apesar de ter sido verificada autocorrelação dos resíduos para os compostos fenólicos ácido ferúlico, ácido vanílico e pinobanksin, as demais premissas foram atendidas além de outros parâmetros de validação não terem sido afetados pela autocorrelação para estes analitos. Desta forma, pode-se afirmar que a escolha do modelo MMQO é adequado uma vez que não comprometeu a confiabilidade do método e que a faixa de trabalho escolhida para cada analito foi linear.

3.2.2 Efeito de matriz

Para a avaliação do efeito de matriz, foram comparadas as inclinações das curvas de calibração em solução padrão e em matriz. Na Tabela 2.13, são apresentados os valores de t calculado e tabelado para cada composto.

Tabela 2.13 – Valores de t utilizados para verificação de efeito de matriz (continua)

Composto fenólico	t calculado	t tabelado	Composto fenólico	t calculado	t tabelado
Ácido benzoico	1,98657	2,77644	Ácido <i>p</i> -cumárico	-0,21313	2,77644
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	0,81340	2,77644	Ácido vanílico	0,34926	2,77644
Siringaldeído	-0,15280	2,77644	Ácido gálico	-1,63751	2,77644

Tabela 2.13 – Valores de t utilizados para verificação de efeito de matriz (conclusão)

Composto fenólico	t calculado	t tabelado	Composto fenólico	t calculado	t tabelado
Ácido fértilico	-2,69929	2,77644	4-metilumbeliferona	4,11022	4,30265
Ácido siríngico	0,88706	2,77644	Coniferaldeído	-2,65194	2,77644
Pinocembrin	-2,29875	2,77644	Ácido cafeico	1,85084	4,30265
Galangina	-0,45678	2,77644	Sinapaldeído	-2,71074	2,77644
Apigenina	-0,30486	4,30265	Ácido sinápico	2,64887	2,77644
Kaempferol	-2,21231	2,77644	Crisina	-3,09158	3,18244
Luteolina	1,32666	2,77644	Naringenina	2,00932	2,77644
Epicatequina	0,45201	2,77644	Pinobanksin	1,78016	4,30265
Catequina	-2,35935	2,77644	Quercetina	-1,11034	2,77644
Ácido clorogênico	-1,55264	2,77644	Isoramnetina	2,99102	3,18244
Hesperidina	0,40593	4,30265	Epigallocatequina galato	0,06042	2,77644
Ácido salicílico	3,25583	4,30265	Naringina	-3,09693	3,18244
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	2,64413	2,77644	Rutina	-0,58698	3,18244

Fonte: Próprio autor (2015).

Para todos os analitos, nas faixas estudadas, não houve efeito de matriz, uma vez que o t calculado foi menor que o t tabelado, como observado na Tabela 2.13. Desta forma, a quantificação dos analitos nas amostras foi efetuada com o uso de curva de calibração em solução padrão. Ainda, pela não existência de efeito de matriz e pelo grande número de analitos investigados, não foi realizada a aplicação dos testes estatísticos referentes à linearidade nas curvas de calibração em matriz.

3.2.3 Seletividade

A presença de possíveis interferentes na matriz que pudessem afetar a identificação e quantificação dos analitos foi investigada pelo estudo da seletividade do método. Na Tabela 2.14 é apresentada a média, DP e faixa de variação para curva de calibração em solução padrão para todos os analitos.

Tabela 2.14 – Valores da média \pm DP da razão dos íons e faixa de variação para a curva de calibração da solução padrão (continua)

Composto fenólico	Média \pm DP	Faixa de variação	Composto fenólico	Média \pm DP	Faixa de variação
Ácido benzoico	0,32 \pm 0,02	0,24-0,40	Ácido <i>p</i> -cumárico	0,11 \pm 0,01	0,08-0,14
Ácido <i>p</i> -amino-benzoico	0,65 \pm 0,05	0,52-0,78	Ácido vanílico	0,30 \pm 0,04	0,24-0,40
Siringaldeído	0,75 \pm 0,08	0,60-0,91	Ácido gálico	0,10 \pm 0,01	0,05-0,15
Ácido ferúlico	0,63 \pm 0,10	0,51-0,76	4-metilumbeliferona	0,75 \pm 0,01	0,60-0,90
Ácido sirínico	0,77 \pm 0,05	0,61-0,92	Coniferaldeído	0,32 \pm 0,06	0,24-0,40
Pinocembrin	0,33 \pm 0,02	0,24-0,41	Ácido cafeico	0,03 \pm 0,004	0,01-0,04
Galangina	0,44 \pm 0,04	0,33-0,55	Sinapaldeído	0,28 \pm 0,03	0,21-0,35

Tabela 2.14 – Valores da média \pm DP da razão dos íons e faixa de variação para a curva de calibração da solução padrão (conclusão)

Composto fenólico	Média \pm DP	Faixa de variação	Composto fenólico	Média \pm DP	Faixa de variação
Apigenina	0,28 \pm 0,05	0,21-0,35	Ácido sinápico	0,89 \pm 0,05	0,71-1,07
Kaempferol	0,39 \pm 0,04	0,29-0,48	Crisina	0,68 \pm 0,08	0,54-0,81
Luteolina	0,31 \pm 0,03	0,23-0,39	Naringenina	0,85 \pm 0,05	0,68-1,02
Epicatequina	0,50 \pm 0,04	0,25-0,74	Pinobanksin	0,67 \pm 0,02	0,53-0,80
Catequina	0,55 \pm 0,11	0,44-0,66	Quercetina	0,21 \pm 0,01	0,16-0,27
Ácido clorogênico	0,41 \pm 0,07	0,31-0,51	Isoramnetina	0,18 \pm 0,01	0,13-0,23
Hesperidina	0,45 \pm 0,08	0,34-0,57	Epigallocatequina galato	0,66 \pm 0,04	0,53-0,79
Ácido salicílico	0,11 \pm 0,02	0,07-0,14	Naringina	0,69 \pm 0,01	0,55-0,83
Ácido 3,4-dihidroxi-benzoico	0,05 \pm 0,01	0,03-0,08	Rutina	0,52 \pm 0,04	0,41-0,62

Legenda: DP – desvio padrão (n=3).

Fonte: Próprio autor (2015).

A razão média da área dos íons para cada analito nas amostras analisadas não ultrapassou a faixa de variação definida (conforme apresentado na Tabela 2.14), indicando que o método é seletivo (idem item 2.4.3, materiais e métodos), com exceção do analito rutina. Este fato se deve a co-eluição da rutina com um composto interferente de mesma massa molar, observado nas amostras de mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benthham) da região de Urubici e Urupema. Apesar da otimização da separação cromatográfica, não foi possível a separação dos picos da rutina e do composto desconhecido, além de não ter sido encontrado relatos na literatura sobre outros compostos fenólicos possivelmente presentes em méis com a mesma massa molar, salvo o composto fenólico hesperidina, que já está incluso no método proposto e bem resolvido. Portanto, pela presença da rutina nas amostras analisadas, optou-se pela manutenção deste analito no

método, sendo a sua quantificação expressa como a somatória da concentração de rutina e do composto desconhecido.

3.2.4 Precisão

A precisão do método, para todos os analitos, foi avaliada em todos os níveis de concentração em curva de calibração de solução padrão. O menor e maior desvio padrão relativo da área do pico para a repetibilidade e reprodutibilidade parcial de cada analito são apresentados na Tabela 2.15.

Tabela 2.15 – Valor mínimo e máximo de DPR (%) obtido para área do pico de cada analito para precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio em curva de calibração de solução padrão

Composto fenólico	Precisão intra-ensaio*	Precisão inter-ensaio**	Composto fenólico	Precisão intra-ensaio*	Precisão inter-ensaio**
	Variação do DPR (%)	Variação do DPR (%)		Variação do DPR (%)	Variação do DPR (%)
Ácido benzoico	1,21 – 13,7	1,79 – 12,4	Ácido <i>p</i> -cumárico	3,04 – 11,6	1,61 – 16,9
Ácido <i>p</i> -amino-benzoico	2,03 – 16,5	5,36 – 18,5	Ácido vanílico	1,14 – 17,6	1,08 – 11,8
Siringaldeído	3,81 – 18,6	8,79 – 16,6	Ácido gálico	3,64 – 15,9	8,20 – 19,1
Ácido ferúlico	1,13 – 13,4	1,34 – 17,9	4-metilumbeliferona	0,14 – 5,90	4,81 – 12,9
Ácido síringico	2,07 – 17,5	1,06 – 15,9	Coniferaldeído	0,88 – 13,6	1,36 – 15,4
Pinocembrin	0,35 – 10,9	0,96 – 8,03	Ácido cafeico	0,17 – 9,12	5,83 – 18,4
Galangina	4,61 – 12,5	5,19 – 9,39	Sinapaldeído	0,34 – 18,5	4,32 – 19,6
Apigenina	3,88 – 13,6	1,62 – 13,3	Ácido sinápico	2,37 – 14,8	10,6 – 16,9
Kaempferol	1,38 – 18,4	3,41 – 11,1	Crisina	3,61 – 13,2	1,49 – 12,2
Luteolina	2,05 – 17,6	6,43 – 19,8	Naringenina	1,69 – 11,6	0,84 – 14,2
Epicatequina	3,86 – 17,8	3,03 – 15,9	Pinobanksin	2,49 – 9,70	1,23 – 8,72
Catequina	4,12 – 14,7	3,21 – 17,2	Quercetina	1,27 – 16,4	0,34 – 20,0
Ácido clorogênico	3,99 – 18,9	3,84 – 11,9	Isoramnetina	1,91 – 9,31	0,92 – 17,4
Hesperidina	3,79 – 16,9	1,89 – 19,1	Epigallocatequina galato	9,03 – 17,6	9,87 – 19,9
Ácido salicílico	1,57 – 5,87	0,34 – 6,07	Naringina	0,58 – 15,8	4,92 – 17,7
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	2,85 – 14,1	1,10 – 10,4	Rutina	1,02 – 15,1	1,50 – 16,0

Legenda: * para n=3; ** para n=9; DPR (%) – desvio padrão relativo; para as concentrações e número de níveis utilizados consulte item 2.4.1, seção material e métodos.

Fonte: Próprio autor (2015).

Conforme apresentado na Tabela 2.15, para a repetibilidade a faixa de variação do menor valor de DPR entre os analitos variou de 0,14 a 9,03 % para o 4-metilumbeliferona e epigallocatequina galato, respectivamente, enquanto que para o maior valor de DPR, a faixa

variou de 5,87 a 18,9 % para o ácido salicílico e ácido clorogênico, respectivamente. Em relação a reprodutibilidade parcial, o ácido salicílico e a quercetina apresentaram os menores valores de DPR (0,34 %), o qual variou até 10,6 % (ácido sinápico). Para o maior valor de DPR, a faixa de variação entre os analitos foi de 6,07 a 20,0 % para o ácido salicílico e quercetina, respectivamente. Assim, pelos dados obtidos na precisão intra-ensaio e inter-ensaio, nota-se uma grande variação entre o menor e maior valor de DPR dependendo do analito, porém, pode-se considerar os valores de repetibilidade e reprodutibilidade parcial adequados, uma vez que o DPR apresentou valor abaixo de 20 %, valor máximo estabelecido pela Directiva 657 para a faixa de concentração estudada (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

3.2.5 Exatidão

Na verificação da exatidão, a recuperação aparente foi avaliada em três níveis de concentração, como apresentado na Tabela 2.16.

Tabela 2.16 – Valores médios de recuperação aparente para mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) em três níveis de concentração

Composto fenólico	% Rec B	% Rec M	% Rec A	Composto fenólico	% Rec B	% Rec M	% Rec A
Ácido benzoico	100,4	96,06	89,04	Ácido <i>p</i> -cumárico	96,70	95,25	87,75
Ácido <i>p</i> -amino- benzoico	81,13	84,94	79,65	Ácido vanílico	101,5	103,0	98,19
Siringaldeído	90,41	94,98	98,64	Ácido gálico	97,78	106,4	93,06
Ácido ferúlico	93,05	92,76	98,91	4-metilumbeli- ferona	100,9	91,84	89,38
Ácido siríngico	106,2	109,7	101,3	Coniferaldeído	91,49	96,05	84,57
Pinocembrin	88,34	99,08	97,19	Ácido cafeico	71,82	76,96	80,10
Galangina	92,94	103,0	98,70	Sinapaldeído	97,31	93,21	92,43
Apigenina	92,26	106,7	100,1	Ácido sinápico	70,38	70,68	93,36
Kaempferol	102,0	107,5	96,54	Crisina	87,95	95,22	89,86
Luteolina	98,53	107,1	94,18	Naringenina	94,67	96,79	94,28
Epicatequina	80,01	106,9	101,1	Pinobanksin	97,21	100,2	97,02
Catequina	102,1	93,38	89,91	Quercetina	92,38	98,33	87,34
Ácido clorogênico	84,67	87,27	93,84	Isoramnetina	92,93	103,4	92,18
Hesperidina	92,48	100,6	98,89	Epigallocatequina galato	78,88	85,55	75,50
Ácido salicílico	108,3	109,2	109,6	Naringina	90,96	90,54	89,89
Ácido 3,4-dihi- droxibenzoico	98,02	103,4	101,6	Rutina	100,6	109,6	101,0

Legenda: B – nível de concentração baixo; M – nível de concentração médio; A – nível de concentração alto; % Rec – porcentagem de recuperação aparente.

Fonte: Próprio autor (2015).

De acordo com os dados mostrados na Tabela 2.16, para o nível de concentração baixo, os valores de recuperação aparente variaram de 70,38 a 108,3 %. Para o nível intermediário, os analitos apresentaram valores de recuperação entre 70,68 a 109,7 %, enquanto que para o nível de concentração alto, os valores variaram de 75,50 a 109,6 %. Os resultados de recuperação aparente obtidos neste estudo estão de acordo com os valores definidos pelo MAPA (BRASIL, 2011b) para todos os analitos, onde o ácido *p*-aminobenzoico, ácido cafeico, ácido sinápico e epigallocatequina galato apresentaram valores de recuperação enquadrados na faixa de 70 - 110 % e os demais analitos variaram de 80 - 110 %.

3.2.6 Limites de detecção e quantificação

Através da relação sinal do analito/sinal do ruído, foi estabelecido experimentalmente o LD e o LQ de cada analito, conforme mostrado na Tabela 2.17.

Tabela 2.17 – Valores médios de LD e LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) para a curva de calibração da solução padrão dos analitos

Composto fenólico	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) Média \pm DP	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) Média \pm DP	Composto fenólico	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) Média \pm DP	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) Média \pm DP
Ácido benzoico	3,20 \pm 0,50	12,8 \pm 1,89	Ácido <i>p</i> -cumárico	0,20 \pm 0,03	0,80 \pm 0,07
Ácido <i>p</i> -amino- benzoico	0,20 \pm 0,03	1,60 \pm 0,14	Ácido vanílico	0,20 \pm 0,03	0,40 \pm 0,05
Siringaldeído	0,40 \pm 0,06	1,60 \pm 0,14	Ácido gálico	0,80 \pm 0,13	1,60 \pm 0,22
Ácido ferúlico	1,60 \pm 0,27	3,20 \pm 0,19	4-metilumbelife- rona	0,20 \pm 0,03	0,80 \pm 0,04
Ácido siríngico	0,80 \pm 0,14	1,60 \pm 0,14	Coniferaldeído	0,20 \pm 0,02	1,60 \pm 0,21
Pinocembrin	0,20 \pm 0,01	0,40 \pm 0,03	Ácido cafeico	1,60 \pm 0,19	3,20 \pm 0,22
Galangina	0,20 \pm 0,01	1,60 \pm 0,15	Sinapaldeído	0,20 \pm 0,02	0,40 \pm 0,07
Apigenina	0,20 \pm 0,01	0,80 \pm 0,06	Ácido sinápico	0,20 \pm 0,03	0,80 \pm 0,09
Kaempferol	0,20 \pm 0,03	1,60 \pm 0,29	Crisina	0,20 \pm 0,02	0,80 \pm 0,09
Luteolina	0,20 \pm 0,03	0,40 \pm 0,07	Naringenina	0,10 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02
Epicatequina	0,40 \pm 0,06	1,60 \pm 0,19	Pinobanksin	0,03 \pm 0,005	0,46 \pm 0,02
Catequina	0,40 \pm 0,06	1,60 \pm 0,19	Quercetina	0,05 \pm 0,008	0,80 \pm 0,05
Ácido clorogênico	0,10 \pm 0,02	0,40 \pm 0,04	Isoramnetina	0,13 \pm 0,01	0,50 \pm 0,04
Hesperidina	0,20 \pm 0,03	0,40 \pm 0,05	Epigallocatequina galato	0,03 \pm 0,005	0,80 \pm 0,11
Ácido salicílico	0,20 \pm 0,03	3,20 \pm 0,43	Naringina	0,05 \pm 0,009	0,80 \pm 0,12
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	0,40 \pm 0,05	0,80 \pm 0,01	Rutina	0,10 \pm 0,02	0,40 \pm 0,06

Legenda: LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação; DP – desvio padrão.

Fonte: Próprio autor (2015).

De acordo com a Tabela 2.17, nota-se que o menor LD foi obtido para os analitos pinobanksin e epigallocatequina galato ($0,03 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que o maior LD foi verificado para o ácido benzoico ($3,20 \mu\text{g L}^{-1}$). Em relação ao LQ, o menor valor foi determinado para a naringenina ($0,20 \mu\text{g L}^{-1}$) e o maior valor para o ácido benzoico ($12,8 \mu\text{g L}^{-1}$). Verificou-se portanto, que o ácido benzoico apresentou o LD e LQ maiores que os demais analitos, sugerindo maior dificuldade de ionização no sistema de ionização por electrospray. Ainda, nota-se que os dados mostrados na Tabela 2.17, apresentaram valores aceitáveis de DPR a baixo de 20 % (EUROPEAN COMISSION, 2002), indicando confiabilidade dos dados obtidos.

3.2.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada pelo teste de *Youden*, onde o efeito das alterações sofridas pelo método sobre a concentração dos analitos está apresentada na Tabela 2.18.

Tabela 2.18 – Efeito dos parâmetros analíticos avaliados na robustez do método

Composto fenólico	Parâmetros analíticos						
	A - a	B - b	C - c	D - d	E - e	F - f	G - g
Ácido benzoico	15,6	-11,4	0,06	-6,86	7,47	-2,24	-13,4
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	-0,71	-1,92*	-0,44	-0,20	-1,05*	0,32	-0,22
Siringaldeído	-1,18	-1,92*	0,20	-1,19	0,15	0,45	-0,15
Ácido férilico	0,05	-3,00*	-0,07	-1,75	-0,87	-1,71	0,84
Ácido siringico	0,69	-2,09*	0,73	-1,09	-0,84	-0,56	-0,45
Pinocembrin	-0,39	-1,15*	0,32	-0,17	-0,41	0,29	-0,19
Galangina	0,64	-0,70	0,63	-0,52	-0,19	-0,30	-0,51
Apigenina	-0,79	-1,16*	-0,16	-0,28	-1,19*	0,48	-0,01
Kaempferol	-0,73	-3,82*	0,33	-2,98*	-0,61	-0,75	0,88
Luteolina	0,07	-2,00*	0,77	-0,76	-0,62	-0,72	0,58
Epicatequina	0,57	-1,00*	-0,20	-1,00*	-0,37	0,06	0,21
Catequina	-0,04	-1,47*	0,69	-0,87	-1,14*	0,19	0,34
Ácido clorogênico	-0,73	-3,55*	-0,31	-0,47	0,45	0,04	0,29
Hesperidina	1,59	-2,74*	1,63	-1,85	1,31	-1,15	-0,77
Ácido salicílico	1,06	-12,9*	6,00	-14,7*	2,70	7,31	-7,02
Ácido 3,4-hidroxibenzoico	-1,22	-3,43	3,42	-7,44*	4,22	6,94*	1,77
Ácido <i>p</i> -cumárico	-0,20	-4,36*	3,37	-0,64	4,64*	2,16	-3,23
Ácido vanílico	0,17	-0,49*	-0,05	-0,35	-0,39*	0,26	0,11
Ácido gálico	-8,24	-8,06	17,2*	-13,4*	1,27	4,22	-4,12
4-metilumbeliferona	0,27	-0,23	0,34	-0,16	0,85*	0,71*	0,10
Coniferaldeído	0,46	0,19	-0,35	-0,07	0,56	0,84	-0,22
Ácido cafeico	0,56	-0,33	2,22	-0,67	1,41	3,37*	0,75
Sinapaldeído	-0,12	-0,98*	-0,05	-0,76	-0,73	1,06*	0,05
Ácido sinápico	-0,91	-1,14*	0,01	-0,14	-0,87	1,56*	0,14

Crisina	0,23	-0,10	0,70	-0,39	-0,57	0,48	-0,21
Naringenina	0,08	-1,11*	0,23	-0,82	-0,58	0,03	0,12
Pinobanksin	0,20	-1,29*	-0,23	-0,38	-0,37	0,11	-0,42
Quercetina	-0,66	-3,12*	2,20	-2,66*	-0,56	-0,67	0,46
Isoramnetina	-0,24	-1,51*	0,64	0,4	0,09	0,34	0,57
Epigallocatequina galato	1,97	-4,06*	1,68	0,89	-2,28	4,83*	-0,07
Naringina	-0,11	-0,21	0,41	-0,14	-0,18	0,69*	0,19
Rutina	-0,33	-0,83	0,46	-0,13	-0,29	0,85	0,54

Legenda: valores obtidos pela equação de *Youden* (item 2.4.7, seção material e métodos); * diferença significativa ($p < 0,05$) entre a condição nominal e alterada, pelo teste *t*; parâmetros avaliados: parâmetro A (porcentagem de ácido fórmico nas fases móveis A e B); parâmetro B (volume de injeção); parâmetro C (temperatura da coluna); parâmetro D (vazão); parâmetro E (proporção água:acetonitrila da fase móvel para diluição); parâmetro F (tempo de abertura da válvula de descarte); parâmetro G (tempo de equilíbrio da coluna).

Fonte: Próprio autor (2015).

Limites máximos aceitáveis para classificar se o método é robusto ou não, não são estabelecidos pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) (BRASIL, 2011a), órgão que recomenda o uso do teste de *Youden*, porém, de acordo com a Tabela 2.18, os resultados mostram que para a maior parte dos analitos avaliados, o volume de injeção (parâmetro B) apresentou os maiores desvios em relação aos demais parâmetros, indicando ser possivelmente o parâmetro menos robusto do método. Ainda, para este e demais parâmetros, valores superiores a $\pm 2,00$ foram observados em alguns casos, porém, grande prevalência de valores menores que $\pm 1,00$ foi verificada. Considerando valores acima de $\pm 2,00$, os analitos ácido benzoico e ácido gálico apresentaram valores superiores para o parâmetro A (porcentagem de ácido fórmico da fase móvel A e B); para o parâmetro B, 12 analitos apresentaram valores superiores a $\pm 2,00$; para o parâmetro C (temperatura da coluna), seis analitos (ácido salicílico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido cafeico e quercetina) apresentaram valores superiores a $\pm 2,00$; para o parâmetro D (vazão), seis analitos (ácido benzoico, kaempferol, ácido salicílico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido gálico e quercetina) apresentaram valores superiores a $\pm 2,00$; para o parâmetro E (proporção água:acetonitrila da fase móvel para diluição), cinco analitos (ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico e epigallocatequina galato) apresentaram valores superiores a $\pm 2,00$ para este parâmetro; para o parâmetro F (tempo de abertura da válvula de descarte), sete analitos (ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido cafeico e epigallocatequina galato) apresentaram valores superiores a \pm

2,00; e para o parâmetro G (tempo de equilíbrio da coluna), quatro analitos (ácido benzoico, ácido salicílico, ácido *p*-cumárico e ácido gálico) apresentaram valores acima de $\pm 2,00$. Portanto, principalmente os analitos ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico e ácido gálico parecem ser os compostos fenólicos mais sensíveis à alterações no método, além de o volume de injeção ser possivelmente o parâmetro menos robusto para a maior parte dos analitos.

Entretanto, é importante ser destacado que concentrações mais elevadas foram encontradas, em especial, para os analitos ácido benzoico, ácido salicílico e ácido 3,4-dihidroxibenzoico, portanto, o valor médio obtido pelo uso da equação recomendada pelo teste de *Youden* irá gerar por consequência valores maiores para estes compostos do que para os demais analitos, o qual não significa necessariamente que esses analitos sofram maior influência de determinados parâmetros do que analitos que apresentaram valores menores pela equação recomendada pelo teste de *Youden*. Por este motivo, a aplicação de testes estatísticos, como o teste *t*, consiste em uma boa ferramenta para assegurar quais são os parâmetros analíticos que apresentam real influência na quantificação de cada composto fenólico.

Assim, a partir da aplicação do teste *t*, diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre as condições nominal e alterada para o parâmetro de volume de injeção (parâmetro B) em 22 analitos, sendo, portanto, o parâmetro analítico mais susceptível a gerar alterações na concentração dos analitos. Para o parâmetro D (vazão), os analitos kaempferol, epicatequina, ácido salicílico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido gálico e quercetina apresentaram variações significativas ($p < 0,05$) em seus valores de concentração nas condições avaliadas. Os analitos ácido *p*-aminobenzoico, apigenina, catequina, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico e 4-metilumbeliferona se mostraram sensíveis ($p < 0,05$) a alterações da proporção água:acetonitrila na fase móvel de diluição (parâmetro E). A variação no tempo de abertura da válvula de descarte (parâmetro F) promoveu diferenças significativas ($p < 0,05$) na concentração dos analitos ácido 3,4-dihidroxibenzoico, 4-metilumbeliferona, ácido cafeico, sinapaldeído, ácido sinápico, epigallocatequina galato e naringina, enquanto que para o parâmetro C (temperatura da coluna), apenas o ácido gálico se mostrou sensível ($p < 0,05$) a alteração deste parâmetro. Para os parâmetros A e G as modificações promovidas no método não geraram alteração na concentração dos analitos de forma significativa ($p < 0,05$), indicando que o método pode ser considerado robusto para o parâmetro variação

de ácido fórmico nas fases móveis A e B (parâmetro A) e tempo de equilíbrio da coluna (parâmetro G) testadas.

Desta forma, maior controle, em especial, em relação ao volume de injeção, vazão, tempo de abertura da válvula de descarte e proporção água:acetoneitrila na fase móvel de diluição devem ser tomados durante a realização das análises. Entretanto, pode-se considerar que o método apresenta robustez adequada, uma vez que atualmente os sistemas cromatográficos são completamente automatizados, fato que dificulta erros instrumentais razoáveis no volume de injeção, vazão, tempo de abertura da válvula de descarte ou temperatura da coluna, como os aplicados neste estudo. Ainda, erros humanos como na proporção água:acetoneitrila na fase móvel de diluição são minimizados através da execução dos procedimentos experimentais com maior atenção.

Portanto, a partir dos resultados obtidos pela aplicação do teste *t*, nota-se que interpretações equivocadas referentes aos parâmetros analíticos testados seriam feitas para alguns analitos caso utilizada a análise direta dos dados fornecidos pela equação recomendada pelo teste de *Youden*, fato que destaca a importância do uso complementar de ferramentas estatísticas na avaliação da robustez de métodos analíticos.

3.3 Aplicação do método em compostos fenólicos de amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)

Após a validação do método proposto, este foi aplicado na determinação de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Na Tabela 2.19, são apresentados os resultados obtidos para as nove amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) analisadas neste estudo.

Pinobanksin 5,110 ± 0,280 4,400 ± 0,250 1,590 ± 0,030 2,300 ± 0,150 8,070 ± 0,100 6,730 ± 0,230 3,940 ± 0,630 1,850 ± 0,080 2,910 ± 0,040

Tabela 2.19 – Identificação e quantificação ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de compostos fenólicos em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) (conclusão)

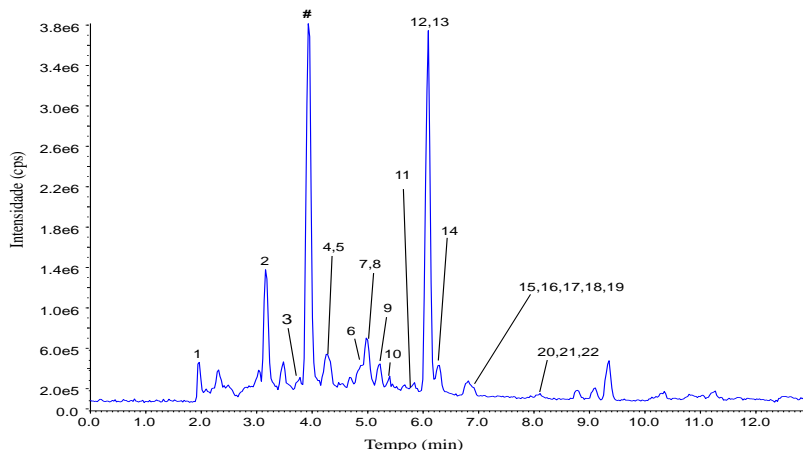
Composto fenólico	Urupema			Urubici			Lages		
	URA1	URA2	URA3	UBA1	UBA2	UBA3	LGA1	LGA2	LGA3
Pinocembrin	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	6,420 ± 0,440	1,740 ± 0,330	0,970 ± 0,120
Quercetina	16,44 ± 0,760	15,11 ± 2,020	16,64 ± 1,210	6,830 ± 1,010	34,75 ± 1,440	33,02 ± 1,670	71,41 ± 11,03	36,80 ± 1,440	24,07 ± 0,330
Rutina / composto desconhecido	12,87 ± 0,330	8,700 ± 0,100	8,690 ± 0,230	1,940 ± 0,010	16,78 ± 3,000	12,09 ± 0,990	69,06 ± 8,000	40,51 ± 3,930	21,68 ± 1,330
Sinapaldeído	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Siringaldeído	5,040 ± 0,710	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	6,550 ± 0,440	< LQ	< LQ

Legenda: LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação.

Fonte: Próprio autor (2015).

Como mostrado na Tabela 2.19, o ácido benzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e o ácido salicílico foram os compostos encontrados em maior concentração em todas as amostras analisadas, podendo-se considerar o ácido benzoico como o composto fenólico, dentre os pesquisados, mais abundante em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Foram quantificados em todas as amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) os compostos ácido ferúlico, ácido siríngico, kaempferol, luteolina, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, naringenina, pinobanksin, quercetina, iroramnetina e rutina/composto desconhecido, o qual apresentaram valores distintos conforme a amostra analisada. Ainda, não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas os compostos epigallocatequina galato, epicatequina, catequina, ácido vanílico, 4-metilumbeliferona, sinapaldeído, ácido sinápico e naringina, sendo que o ácido *p*-aminobenzoico apresentou valores abaixo do LQ para todas as amostras. Em relação aos demais compostos fenólicos, cada amostra apresentou uma tendência distinta: o ácido cafeico apenas não foi quantificado na amostra UBA1; a apigenina foi quantificada apenas nas amostras UBA1 e LGA1; o coniferaldeído foi quantificado apenas nas amostras da região de Urupema; a crisina e galangina apenas quantificadas na amostra LGA1; a hesperidina quantificada nas amostras da região de Lages e UBA2; o pinocembrin apenas nas amostras da região de Lages e o siringaldeído apenas nas amostras URA1 e LGA1. Nota-se ainda que a amostra LGA1 foi a amostra de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) analisada que apresentou o maior número de compostos fenólicos quantificados. Na Figura 2.2 é apresentado o TIC dos compostos fenólicos quantificados nesta amostra.

Figura 2.2 – Cromatograma de íons totais dos compostos fenólicos quantificados na amostra LGA1 de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)



Legenda: 1 – ácido gálico; 2 – ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 3 – ácido clorogênico; 4 – ácido cafeico; 5 – ácido sirínico; 6 – rutina; 7 – ácido *p*-cumárico; 8 – siringaldeído; 9 – ácido ferúlico; 10 – hesperidina; 11 – ácido benzoico; 12 – ácido salicílico; 13 – luteolina; 14 – quercetina; 15 – apigenina; 16 – naringenina; 17 – pinobanksin; 18 – kaempferol; 19 – isoramnetina; 20 – crisina; 21 – pinocembrin; 22 – galangina; # – composto desconhecido.

Fonte: Próprio autor (2015).

Como observado no cromatograma mostrado na Figura 2.2, foram quantificados 22 compostos fenólicos na amostra LGA1 de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Ainda, nota-se que um composto com intensidade próxima ao ácido salicílico foi detectado pelo método no tempo de 3,95 min, em todas as amostras analisadas. Pela análise dos cromatogramas dos íons de quantificação e de confirmação de cada composto fenólico analisado, observou-se que este composto desconhecido apresenta a mesma massa molar do ácido salicílico, sendo possivelmente o ácido 4-hidroxibenzoico uma vez que a presença deste analito é relatada em méis de melato de diferentes origens (CAN et al., 2015; TRAUTVETTER; KOELLING-SPEER; SPEER, 2009).

Na Tabela 2.20 são apresentados valores encontrados por outros autores em méis de melato de diferentes origens para os compostos fenólicos quantificados em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham).

Tabela 2.20 – Valores relatados em méis de melato para os fenólicos quantificados em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) (continua)

Composto fenólico ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	Referência bibliográfica									
	Daher e Gülaçar (2008)	Trautvetter, Koelling- Speer e Speer (2009)	Jerkovic e Marijanovi c (2010)	Lachmann et al. (2010a)	Socha et al. (2011)	Haroun et al. (2012)	Escriche et al. (2014)	Silici, Sarioglu e Karaman (2014)	Can et al. (2015)	Presente estudo
Ácido benzoico	93,3 – 305,9	Presença	Presença	-	-	-	-	nd	-	66,41 – 1520
Ácido caféico	-	Presença	-	-	46,45	nd – 94,1	1600	nd – 21	880 – 2678	<LD – 84,46
Ácido clorogênico	-	Presença	-	-	7,12	-	-	nd – 250	nd	8,980 – 57,09
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	Presença	-	-	534,30	3,9 – 35,5	31400	-	466 – 1595	31,48 – 85,72
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	-	Presença	-	-	-	163,9 – 598,6	-	-	924 – 74460	102,4 – 228,4
Ácido férilico	nd – 21,8	Presença	-	50 - 820	18,31	nd – 16,6	-	nd – 24	nd – 419	10,21 – 56,22
Ácido gálico	-	Presença	-	-	136,51	-	-	11 – 295	nd – 8249	29,15 – 43,17
Apigenina	-	Presença	-	nd	-	nd – 16,7	-	-	nd – 3483	<LD – 3,050
Ácido salicílico	71,2 – 705,9	Presença	Presença	-	-	-	-	-	-	75,71 – 237,7
Ácido síringico	-	Presença	-	-	50,13	nd – 303,4	-	nd	nd – 1878	14,91 – 77,89
Coniferaldeído	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<LD – 13,97
Crisina	142,4 – 470,6	Presença	-	10 – 40	nd	2,69 – 27,7	1900	nd	-	<LD – 6,400
Galangina	-	-	-	-	nd	-	1400	-	-	<LD – 4,670
Hesperidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<LD – 26,40
Isoramnentina	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	4,440 – 12,91
Kaempferol	-	Presença	-	-	17,61	nd	400	nd	nd	6,940 – 32,21
Luteolina	-	-	-	-	-	nd	-	nd	-	3,950 – 14,40
Naringenina	-	-	-	-	98,82	-	1800	-	-	1,200 – 6,440
Pinobanksin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,590 – 8,070
Pinocebrin	355,4 – 764,1	-	-	-	-	4,48 – 17,7	1900	nd	-	<LD – 6,420
Quercetina	-	Presença	-	-	21,31	nd – 65,7	900	nd	nd	6,830 – 71,41
Rutina	-	-	-	-	-	-	-	-	nd – 53862	1,940 – 69,06

Tabela 2.20 – Valores relatados em méis de melato para os fenólicos quantificados em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) (conclusão)

Composto fenólico (µg 100 g ⁻¹)	Referência bibliográfica									
	Daher e Gülaçar (2008)	Trautvetter, Koelling-Speer e Speer (2009)	Jerkovic e Marijanovic (2010)	Lachmann et al. (2010a)	Socha et al. (2011)	Haroun et al. (2012)	Escriche et al. (2014)	Silici, Sarioglu e Karaman (2014)	Can et al. (2015)	Presente estudo
Siringaldeído	-	-	Presença	-	-	-	-	-	-	<LQ = 6,550
Técnica analítica	GC-MS	UPLC-MS	GC-MS	HPLC-DAD	HPLC-UV-Vis	HPLC-UV-Vis	HPLC-UV-Vis	HPLC-DAD	HPLC-UV-Vis	LC-ESI-MS/MS
Origem geográfica / botânica do mel de melato	ni / <i>Quercus</i> spp., <i>Abies alba</i> Miller, de árvores coníferas, da região de pirineus	ni / ni	ni / <i>Quercus frainetto</i> Ten.	Tcheca / ni	Polonia / ni	Turquia / <i>Pinus</i> spp	Espanha / Florestal	Turquia / ni	Turquia / <i>Tilia platyphyllos</i> , <i>Quercus</i> sp. L.	Brasil / bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham)

Legenda: (-) não determinado; nd – não detectado; HPLC (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*); GC (do inglês *Gas Chromatography*); UPLC (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*); LC (do inglês *Liquid Chromatography*); MS (do inglês *Mass Spectrometry*); DAD (do inglês *Diode Array Detector*); UV-Vis (ultravioleta e visível). LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação.

Fonte: Próprio autor (2015).

Como observado para os compostos fenólicos listados na Tabela 2.20, o estudo realizado por Trautvetter, Koelling-Speer e Speer (2009) identificou o maior número de compostos fenólicos (13 compostos fenólicos) em méis de melato de diferentes origens botânicas. Este fato está vinculado a um conjunto de fatores como a origem do mel de melato analisado, o preparo de amostra utilizado, bem como a técnica analítica empregada, o qual faz uso da espectrometria de massas, detector altamente empregado na análise de compostos minoritários como os compostos fenólicos, devido a sua alta sensibilidade e seletividade.

Comparativamente ao mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth), Trautvetter, Koelling-Speer e Speer (2009) também identificaram o ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatecuico), ácido salicílico e ácido benzoico em amostras de mel de melato, bem como Jerkovic e Marijanovic (2010) para o ácido benzoico e ácido salicílico. Pode-se destacar estes três compostos fenólicos como uns dos compostos majoritários encontrados nos estudos de Can et al. (2015), Daher e Gülaçar (2008) e Haroun et al. (2012) em méis de melato, concordando com os dados encontrados neste estudo. Para o ácido benzoico, o mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth) apresentou valores próximos aos encontrados por Daher e Gülaçar (2008) em méis de melato de diferentes origens botânicas, com exceção das amostras da região de Lages, que apresentaram valores superiores. Para o ácido salicílico, Daher e Gülaçar (2008) relataram valores maiores em méis de melato de diferentes origens botânicas em comparação com os encontrados nas amostras de mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth). Esta mesma tendência foi observada para o ácido protocatecuico relatado por Can et al. (2015) e Haroun et al. (2012), onde apesar de utilizarem a mesma técnica analítica, estes autores encontraram entre si valores muito distintos, sugerindo principalmente a influência da matriz alimentar no conteúdo deste composto fenólico, além do procedimento de preparo de amostra.

Para Escriche et al. (2014), o ácido *p*-cumárico foi o composto fenólico encontrado em maior quantidade em mel de melato, estando muito acima dos valores já relatados para este analito em méis de melato em outros trabalhos (CAN et al., 2015; HAROUN et al., 2012; SOCHA et al., 2011) e encontrado neste estudo, mesma tendência observada para os fenólicos naringenina, ácido cafeico, pinocembrin, crisina, galangina e kaempferol. Este fato observado no estudo de Escriche et al. (2014) é possivelmente relacionado a origem do mel de melato estudado, uma vez que a mesma técnica analítica também foi utilizada por outros

autores como Can et al. (2015) e Haroun et al. (2012), bem como um preparo de amostra similar foi empregado por Haroun et al. (2012) e resultados distintos foram obtidos.

Para os compostos fenólicos apresentados na Tabela 2.20, a origem do mel de melato parece ser o fator com maior influência no conteúdo destes fenólicos, onde para o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) valores superiores à alguns estudos relacionados à méis de melato de origens distintas são verificados para o ácido *p*-cumárico (HAROUN et al., 2012), ácido siríngico (HAROUN et al., 2012; SOCHA et al., 2011), ácido ferúlico (DAHER; GÜLAÇAR, 2008; HAROUN et al., 2012; SOCHA et al., 2011), quercetina (HAROUN et al., 2012), ácido clorogênico (SOCHA et al., 2011), naringenina (SOCHA et al., 2011) e ácido cafeico (SILICI; SARIOGLU; KARAMAN, 2014). Ainda, valores similares aos encontrados neste estudo foram observados para a quercetina e kaempferol por Socha et al. (2011), para o ácido clorogênico e ácido ferúlico por Silici, Sarioglu e Karaman (2014) e para o ácido cafeico por Haroun et al. (2012) e Socha et al. (2011), bem como Jerkovic e Marijanovic (2010) também encontraram siringaldeído em méis de melato. Todavia, alguns estudos em méis de melato também relatam valores superiores aos encontrados no mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) como para o ácido gálico (CAN et al., 2015; SILICI; SARIOGLU; KARAMAN, 2014; SOCHA et al., 2011), ácido *p*-cumárico (CAN et al., 2015; SOCHA et al., 2011), ácido ferúlico (CAN et al., 2015; LACHMANN et al., 2010a), pinocembrin (DAHER; GÜLAÇAR, 2008), crisina (DAHER; GÜLAÇAR, 2008; HAROUN et al., 2012; LACHMANN et al., 2010a), bem como para o ácido cafeico, rutina, apigenina e ácido siríngico verificados por Can et al. (2015).

Também é importante destacar que Silici, Sarioglu e Karaman (2014) não detectaram crisina e pinocembrin em amostras de méis de melato, em concordância com o resultado observado neste estudo para as amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) como da região de Urupema e Urubici. Para a apigenina, Haroun et al. (2012) encontraram este fenólico em algumas amostras de méis de melato os quais, quando quantificado, apresentaram valores acima dos encontrados nas amostras analisadas neste estudo em que foi possível a sua quantificação. Ainda, certos compostos fenólicos quantificados em todas as amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) não foram identificados em alguns estudos de méis de melato, como no caso da luteolina e kaempferol por Haroun

et al. (2012) e Silici, Sarioglu e Karaman (2014), da isoramnetina e ácido clorogênico por Can et al. (2015) e do ácido siríngico e quercetina por Silici, Sarioglu e Karaman (2014).

A presença de compostos fenólicos não determinados em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) e, portanto, não apresentados na Tabela 2.20 são reportados em alguns estudos em méis de melato de diferentes origens como o ácido sinápico (SOCHA et al., 2011), epicatequina (CAN et al., 2015; SILICI; SARIOGLU; KARAMAN, 2014), catequina (SILICI; SARIOGLU; KARAMAN, 2014), ácido vanílico (JERKOVIC; MARIJANOVIC, 2010; TRAUTVETTER; KOELLING-SPEER; SPEER, 2009). Porém, Silici, Sarioglu e Karaman (2014) também não detectaram o ácido vanílico em méis de melato, em concordância com os resultados observados neste trabalho.

Portanto, nota-se uma grande variação no conteúdo de um mesmo composto fenólico dependendo em especial da origem do mel de melato analisado. Apesar deste fato, os valores encontrados em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) estão de acordo com muitos estudos da literatura. É importante destacar também que, até o momento, não foram encontrados estudos que relataram a presença de ácido *p*-aminobenzoico, luteolina, hesperidina, isoramnetina, pinobanksin e coniferaldeído em méis de melato, sendo, portanto, relatado pela primeira vez neste estudo a presença destes fenólicos em méis de melato

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi realizada a validação de um método analítico para identificação de 32 compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) utilizando LC-ESI-MS/MS. O método apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros faixa de trabalho e linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade e limites de detecção e quantificação, além de não ser evidenciado efeito de matriz. Neste sentido, a eficiência do método é comprovada o que assegura a confiabilidade dos resultados obtidos e a sua utilização na determinação de compostos fenólicos em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham).

Em relação as amostras de méis analisadas, os ácidos benzoico, salicílico e 3,4-dihidroxibenzoico podem ser considerados os compostos fenólicos majoritários em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), com destaque para o ácido benzoico, que pode ser considerado o composto mais abundante. Além destes, outros 20

compostos fenólicos foram quantificados nas amostras avaliadas, sendo que em nenhuma amostra foram detectados os compostos epigallocatequina galato, epicatequina, catequina, ácido vanílico, 4-metilumbeliferona, sinapaldeído, ácido sinápico e naringina. Enquanto que o ácido *p*-aminobenzoico apresentou valores abaixo do limite de quantificação para todas as amostras. Ainda, a partir deste estudo foram relatados, pela primeira vez, em méis de melato, a presença dos fenólicos: ácido *p*-aminobenzoico, luteolina, hesperidina, isoramnetina, pinobanksin e coniferaldeído.

CAPÍTULO 3 - Bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)

1 INTRODUÇÃO

O mel pode ser definido como um produto alimentício produzido por abelhas melíferas (*Apis mellifera*) que quando produzido a partir do néctar das flores é classificado como mel floral ou de néctar e quando constituído principalmente a partir de secreções de partes vivas de plantas ou de insetos sugadores destas plantas é denominado mel de melato (BRASIL, 2000b).

O tipo e as características do mel a ser produzido dependem fortemente da sua origem botânica e/ou geográfica (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012), dentre os quais a oferta de néctar tem influência. Em Santa Catarina, pela ausência ou diminuição do florescimento de plantas apícolas em certas épocas do ano, destaca-se a importância do exsudato produzido a partir da associação entre a espécie arbórea bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) e insetos denominados cochonilhas (gênero *Tachardiella*) em períodos de florada escassa (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014; MOREIRA et al., 2011; ORTH; MARTINS, 2003).

A *Mimosa scabrella* Benthham é uma espécie arbórea com predominância na região sul do Brasil (DAHMER et al., 2013; SOMARRIBA; KASS, 2001) sendo uma das principais fontes de néctar e pólen para abelhas no período do inverno (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Em outros períodos, o floema da planta é utilizado como alimento pelas cochonilhas que, por sua vez, liberam exsudatos açucarados – também conhecido como melato – que se tornam alternativa de alimento para as abelhas quando há escassez de néctar e pólen (MOREIRA et al., 2011; ORTH; MARTINS, 2003).

Em Santa Catarina, a produção de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) é mais pronunciado entre os meses de janeiro a maio (CAMPOS et al., 2003; MARTINS; ORTH; NARDI, 2003) e atualmente vem sendo fortemente valorizado pelo mercado externo (CAMPOS et al., 2003; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Ainda, devido ao ciclo de vida das cochonilhas possuir um padrão bianual, a produção de melato por estes insetos, e por consequência de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) pelas abelhas, também apresentam um padrão bianual (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014; WITTER et al., 2010) agregando, com isso, mais valor ao mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham).

O mel de melato é normalmente vinculado a maior pH, elevados teores de proteínas, nitrogênio, minerais, cinzas, polissacarídeos

(CAMPOS et al., 2003; MARENDIA et al., 2011), oligossacarídeos em especial a melezitose e rafinose (BOGDANOV et al., 2008) e menores teores de frutose e glicose em comparação com méis florais (CAMPOS et al., 2003; MARIANO-DA-SILVA; MARIANO-DA-SILVA; COSTA-NETTO, 2011). Porém, apesar de suas peculiaridades, o mel é considerado uma matriz complexa (CAMPOS et al., 2003; MARENDIA et al., 2011) constituída de diversos compostos (AL et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010) como carboidratos, considerados os compostos majoritários (MARENDIA et al., 2011), seguido da água e de vários outros componentes como ácidos orgânicos, minerais, polifenóis, carotenoides, aminoácidos, peptídeos e proteínas. Todos estes constituintes podem ser adicionados ao mel pelas abelhas, serem derivados da matéria prima (néctar, pólen ou melato) ou ainda formados ao longo da maturação do mel (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; MARENDIA et al., 2011).

O mel, além de ser considerado um alimento de alta qualidade, é tradicionalmente considerado um agente terapêutico (BERETTA et al., 2005), sendo fortemente vinculado o seu uso à diversos efeitos benéficos à saúde (BOGDANOV et al., 2008; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; HUSSEIN et al., 2013). Essas possíveis características benéficas atribuídas ao mel são relacionadas à presença de diversos componentes considerados bioativos (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012).

O comportamento apresentado por esses compostos bioativos em sistemas *in vivo* pode ser relacionado com estudos *in vitro* para a avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade, demonstrando ser uma eficiente ferramenta no conhecimento de informações sobre possíveis influências do sistema digestório e da própria matriz alimentar na absorção de determinadas substâncias (biodisponibilidade) ou na sua potencialidade de ser absorvido (bioacessibilidade) pelo organismo (ALMINGER et al., 2014; ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012). Nota-se que poucos estudos são encontrados na literatura, até o momento, sobre a bioacessibilidade *in vitro* de diferentes substâncias presentes no mel (DAGLIA et al., 2013; O'SULLIVAN et al., 2013; POHL et al., 2012a).

Desta forma, devido a escassez de estudos em méis avaliando a bioacessibilidade *in vitro* do teor de compostos fenólicos totais, aliado a ausência, (até o momento) em especial, de estudos sobre a bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos individuais, juntamente com as poucas informações sobre a influência da digestão *in vitro* sobre a capacidade antioxidante, considera-se importante o estudo

que contemple todas essas características ao longo a simulação da digestão gastrointestinal em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Portanto, este estudo tem como objetivo determinar a bioacessibilidade *in vitro* do teor de compostos fenólicos totais, de compostos fenólicos individuais por LC-ESI-MS/MS e da capacidade antioxidante *in vitro* em misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) da região do planalto serrano de Santa Catarina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) foram coletadas nas regiões de Urupema (n=3), Lages (n=3) e Urubici (n=3), no estado de Santa Catarina, Brasil, durante a safra de abril a junho de 2014. Imediatamente após a sua coleta, os favos de mel, condicionados em sacos plásticos, foram transportados em caixas térmicas a 5 ± 2 °C até o Laboratório de Química de Alimentos, UFSC. Em seguida, as amostras foram drenadas manualmente dos favos e coletadas em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL, sendo centrifugadas a 2000 rpm por 10 min (Fanem, modelo 280R, São Paulo, São Paulo, Brasil) para retirada de sedimentos e posteriormente armazenadas a -18 ± 2 °C até o momento das análises.

2.2 Reagentes e padrões

Para todas as análises, foi utilizada água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, Massachusetts, Estados Unidos) e reagentes de grau analítico.

Na determinação do teor de compostos fenólicos totais, foram utilizados o reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) e ácido gálico da Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Todas as soluções foram preparadas no dia das análises.

Para a determinação dos compostos fenólicos individuais, foram utilizados os padrões apigenina, isoramnetina, pinobanksin, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido *p*-aminobenzoico, ácido *p*-cumárico, 4-metilumbeliferona, ácido vanílico, rutina, naringina, catequina, sinapaldeído, ácido cafeico, ácido clorogênico, coniferaldeído, siringaldeído, crisina, hesperidina, ácido sirínico, kaempferol,

naringenina, epigallocatequina galato, epicatequina, pinocembrin, galangina e luteolina da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), ácido salicílico da Nuclear (Diadema, São Paulo, Brasil), quercetina da Fluka (Saint Gallen, Suíça), ácido gálico da Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), ácido benzóico da Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha) e ácido 3,4-dihidroxibenzóico da Acros Organic (Geel, Bélgica). Foram utilizados metanol, acetonitrila, ácido fórmico e DMSO adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). As soluções padrões individuais foram preparadas na concentração de 1000 mg L⁻¹, com exceção da isoramnetina (1250 mg L⁻¹) e pinobanksin (1150 mg L⁻¹), em DMSO ou metanol e estocadas a -18 ± 2 °C. Para as análises, semanalmente, a fim de evitar possíveis alterações e/ou degradações, foram preparadas misturas em metanol desses analitos.

Na avaliação da capacidade antioxidante foram utilizados o radical DPPH, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), metanol, ácido clorídrico e ácido cítrico da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) e ácido arcórbico, cloreto férrico, acetato de sódio e sulfato ferroso heptahidratado da Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Todas as soluções foram preparadas no dia das análises.

Para a realização da digestão *in vitro*, foram utilizadas as enzimas pancreatina (pâncreas suíno, P7545) e pepsina (mucosa gástrica suína, P7000), além dos sais biliares taurodeoxicolato de sódio hidratado (T0875), taurocolato de sódio hidratado (86339) e glicodeoxicolato de sódio (G9910) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). Foram utilizados ainda: bicarbonato de sódio (NaHCO₃) da Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e ácido clorídrico (HCl) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). Todas as soluções foram preparadas no dia dos experimentos.

2.3 Instrumentação

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis (Spectro Vision SB 1810-60 S, Beijing, China).

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foi realizada em um sistema constituído por um espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolar AB SCIEX QTRAP® 5500 System (Applied Biosystems, Concord, Califórnia, Estados Unidos) acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). As condições de análise foram

realizadas de acordo com o método validado apresentado no Capítulo 2, item 2.3, seção *Material e Métodos*.

Para a avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*, foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis (Spectro Vision SB 1810-60 S, Beijing, China).

2.4 Preparo das amostras

No dia dos experimentos, as amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) que estavam congeladas a -18 ± 2 °C foram descongeladas e misturadas. Foram preparadas 3 misturas de mel, cada uma constituída por três amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) de uma mesma região misturadas na mesma proporção, de acordo com a Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) utilizadas no preparo das misturas de mel

Mistura de mel	Local	Identificação dos apiários	Mês de coleta
1	Urupema	URA1, URA2, URA3	04/2014
2	Urubici	UBA1, UBA2, UBA3	06/2014
3	Lages	LGA1, LGA2, LGA3	06/2014

Legenda: UR, Urupema; UB, Urubici; LG, Lages; A, apiário; 1, 2, 3, relaciona-se aos distintos Apiários.

Fonte: Próprio autor (2015).

Após a pesagem e homogeneização manual (por inversão) das misturas de mel, estes foram mantidos refrigerados 4 ± 2 °C até o momento das análises, sendo posteriormente o excedente descartado. As misturas de mel foram submetidas à determinação do teor de compostos fenólicos totais, de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS e da capacidade antioxidante *in vitro*, além do procedimento de digestão gastrointestinal *in vitro*.

Para as análises das misturas antes do procedimento de digestão *in vitro*, foram pesadas, em triplicata, em tubos de polipropileno com capacidade para 15 mL, $1,25 \pm 0,001$ g de cada mistura de mel, equivalente a 0,874 mL de mel (densidade média do mel de $1,43 \text{ g mL}^{-1}$), e adicionado 1,460 mL de água ultrapura. Este sistema foi agitado manualmente (por inversão) por 4 min até completa homogeneização. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 min em microcentrifuga refrigerada a 4 °C (Thermo Fischer Scientific Inc., modelo Fresco, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e o

sobrenadante foi utilizado para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS e da capacidade antioxidante *in vitro*.

2.5 Digestão gastrointestinal *in vitro*

Para a avaliação da bioacessibilidade *in vitro* do teor de fenólicos totais, compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante *in vitro* em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham), foi aplicado um sistema de digestão gastrointestinal *in vitro* adaptado a partir dos procedimentos e recomendações apresentadas pela Farmacopeia dos Estados Unidos (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2000), O'Sullivan et al. (2013) e Alminger et al. (2014). Alterações foram necessárias a fim de evitar interferências na análise de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS, sendo que o procedimento foi composto por duas fases sequenciais: etapa gástrica e etapa duodenal.

2.5.1 Preparo das soluções gástrica e duodenal

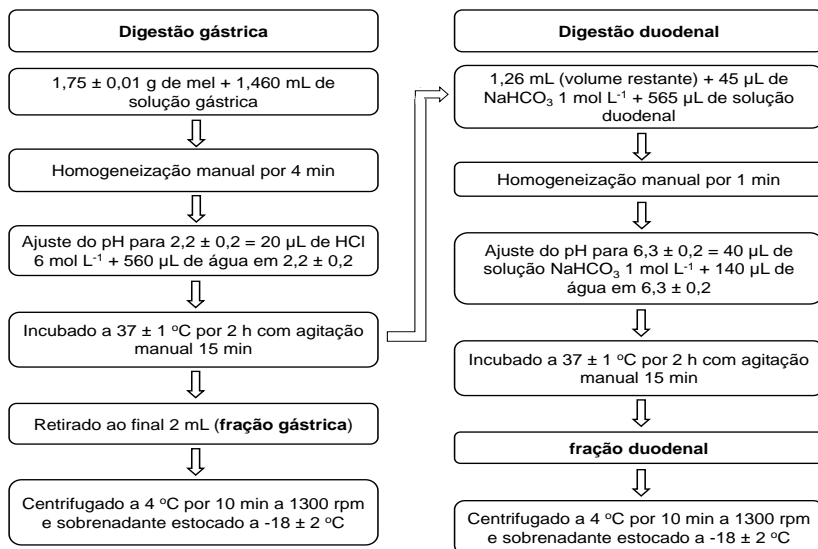
A solução gástrica foi preparada pela dissolução de 0,08 g de pepsina em 0,175 mL de ácido clorídrico 12 mol L⁻¹, seguida da adição de água ultrapura até o volume de 25 mL (em balão volumétrico), apresentando ao final um pH de 1,0 ± 0,2 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2000).

A solução duodenal foi preparada a partir da dissolução de 0,1 g de pancreatina, 0,0188 g de glicodeoxicolato de sódio, 0,0202 g de taurocolato de sódio e 0,0116 g de taurodeoxicolato de sódio em 0,1 mL de NaHCO₃ 0,5 mol L⁻¹ em água ultrapura para um volume final de 10 mL (em balão volumétrico), sendo o pH final de 7,2 ± 0,2 (ALMINGER et al., 2014; O'SULLIVAN et al., 2013; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2000).

2.5.2 Procedimento de digestão *in vitro*

Em tubos de polipropileno com capacidade para 15 mL, cada mistura de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) foi submetido ao processo de digestão *in vitro* apresentado na Figura 3.1.

Figura 3.1 – Procedimento de digestão *in vitro* aplicado em misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)



Fonte: Próprio autor (2016).

A fim de conhecer a influência do sistema gastrointestinal na ausência dos compostos de interesse investigados, foram preparadas amostras chamadas “controle”, nas quais o mel foi substituído por água ultrapura e submetido ao mesmo procedimento de digestão gastrointestinal *in vitro*. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, tanto para amostra controle como para as misturas de mel, sendo que todas as amostras obtidas foram analisadas dentro de 24h. Ao final de cada etapa digestiva, a centrifugação em temperatura baixa, assim como, o imediato congelamento das amostras foram efetuados a fim de garantir a interrupção da atividade enzimática, como recomendado em alguns estudos (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; KOSINSKA-CAGNAZZO et al., 2015).

2.6 Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

O teor de compostos fenólicos totais determinado nas amostras formadas pelas misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) antes e após a digestão *in vitro* foi avaliado pelo

método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). O volume de 4,0 mL de água ultrapura e 100 µL de cada amostra com diluição conhecida foram adicionados a um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, o reagente Folin-Ciocalteu (0,5 mL) foi adicionado ao balão. Após 2 minutos de reação, foi adicionado 1,5 mL de solução de carbonato de sódio 20 % (m/v) e o volume final completo com água ultrapura. Após 2 horas em ausência de luz a absorbância das amostras foi determinada no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos como mg equivalente em ácido gálico (EAG) por 100 g de mel pela interpolação da curva analítica construída com padrão de ácido gálico em 7 níveis de concentração equidistantes variando de 20 a 300 mg L⁻¹.

2.7 Identificação e quantificação de compostos fenólicos utilizando LC-ESI-MS/MS

A determinação e quantificação de compostos fenólicos em misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) e nas amostras submetidas a digestão gastrointestinal *in vitro*, foi realizada de acordo com o método em LC-ESI-MS/MS previamente validado neste estudo. Assim, 100 µL de cada amostra foi diluída em 900 µL de fase móvel (98 % água, 2 % acetonitrila adicionado de 0,1 % ácido fórmico) e posteriormente injetada em LC-ESI-MS/MS. Quando necessário, posteriores diluições das amostras foram realizadas.

2.8 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

Para a determinação da capacidade antioxidante nas três misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) antes e após as digestões gástrica e intestinal *in vitro*, foram aplicados dois métodos espectrofotométricos, descritos a seguir.

2.8.1 Capacidade antioxidante pelo método de desativação de radicais DPPH

O método de desativação de radicais DPPH foi utilizado para avaliação da capacidade antioxidante das amostras e conduzido de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações de Kim et al. (2002). O volume de 2,9 mL de solução de radical DPPH 0,1 mmol L⁻¹ em metanol (80%, v/v) foi adicionado a 100 µL de cada amostra com diluição conhecida e deixada por 30 min em

ausência da luz. A leitura da absorbância da solução de radical DPPH antes da adição das amostras e após os 30 min foram realizadas em 515 nm. A capacidade das amostras em desativar os radicais DPPH foi descrita como porcentagem (% RSA) de acordo com a Equação 3.

$$\% \text{ RSA} = [1 - (\text{absor\~{a}ncia amostra}_{t=30\text{min}} \div \text{absor\~{a}ncia DPPH}_{t=0\text{min}}) \times 100] \quad (3)$$

A seguir, os valores foram expressos em mg equivalente a ácido ascórbico (EAA) em 100 g de mel através de interpolação com curva padrão contruída em 6 níveis de concentração equidistantes variando de 20 – 120 mg L⁻¹.

2.8.2 Capacidade antioxidante pelo método FRAP

O método FRAP foi realizado para avaliação da capacidade antioxidante das amostras de acordo com Benzie e Strain (1996), com modificações de Bertoncelj et al. (2007). Assim, 400 µL de cada amostra com diluição conhecida foi transferida para tubos de propileno com capacidade para 15 mL, sendo adicionado 3,6 mL do reagente FRAP e incubado em banho em temperatura de 37 ± 1 °C por 10 min. Após 10 minutos, a absorbância das amostras foram determinadas em 593 nm. O reagente FRAP foi preparado a partir da mistura, na seguinte ordem: tampão acetato 0,3 mol L⁻¹, pH 3,6 (ajustado com HCl), solução de TPTZ (0,01 mol L⁻¹ em HCl 0,04 mol L⁻¹) e solução de cloreto férrico (0,02 mol L⁻¹), na proporção 10:1:1 (v/v/v), respectivamente. A capacidade antioxidante foi expressa como µmol de Fe⁺² por 100 g de mel a partir da interpolação da curva padrão construída com padrão de sulfato ferroso heptahidratado em 7 níveis de concentração equidistante variando de 20 – 300 µmol L⁻¹.

2.9 Determinação da fração bioacessível de teor de fenólicos totais, compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante

Para a determinação da fração bioacessível (FB) de cada composto fenólico pesquisado, bem como da capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais foi utilizada a Equação 4 sendo os valores expressos em porcentagem.

$$FB (\%) = \frac{\text{concentração do composto na amostra após digestão gástrica ou duodenal}}{\text{concentração do composto na amostra não digerida}} \times 100 \quad (4)$$

2.10 Análise estatística

Todas as análises foram conduzidas em triplicata de preparo e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, com auxílio do programa *Statística 7.0* e Microsoft Excel 2010 com a extensão *Action 2.9*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3.2 são apresentados os resultados obtidos para o teor de fenólicos totais nas misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) antes e após a simulação das digestões gástrica e duodenal.

Tabela 3.2 – Efeito da digestão *in vitro* sobre o teor de compostos fenólicos totais em misturas de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)

Mistura de mel	Etapa da digestão	Teor de fenólicos totais	
		mg EAG 100 g ⁻¹ de mel	Fração bioacessível (%)
Urupema	Sem digestão	109,6 \pm 0,971 ^{aC}	-
	Digestão gástrica	115,9 \pm 2,671 ^a	105,8 ^B
	Digestão duodenal	81,27 \pm 2,290 ^b	74,16 ^A
Urubici	Sem digestão	122,6 \pm 1,342 ^{bB}	-
	Digestão gástrica	144,4 \pm 3,621 ^a	117,7 ^A
	Digestão duodenal	80,63 \pm 3,770 ^c	65,75 ^B
Lages	Sem digestão	142,0 \pm 1,640 ^{aA}	-
	Digestão gástrica	119,7 \pm 2,493 ^b	84,32 ^C
	Digestão duodenal	58,30 \pm 2,621 ^c	41,07 ^C

Legenda: (-) não aplicado; Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ^{a-c} Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna, para a mesma mistura de mel, representam diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey; ^{A-C} Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna, entre diferentes misturas de mel na mesma etapa da digestão, representam diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey; EAG – equivalente a ácido gálico.

Fonte: Próprio autor (2015).

Como observado na Tabela 3.2, o teor de fenólicos totais encontrado para as amostras não digeridas variaram de 109,6 a 142,0 mg EAG 100 g⁻¹, onde a mistura de mel de Lages apresentou valor estatisticamente ($p < 0,05$) maior que as demais amostras, enquanto que o menor valor ($p < 0,05$) foi observado para a mistura de mel de Urupema. Os valores encontrados neste estudo para o teor de fenólicos

totais nas amostras não digeridas foram superiores a vários estudos relatados na literatura para mel de melato de diferentes origens (A-RAHAMAN et al., 2013; BERTONCELJ et al., 2007; 2011; LACHMAN et al., 2010b; MAURYA et al., 2014; ÖZKÖK; D'ARCY; SORKUN, 2010; SOCHA et al., 2011; WILCZYŃSKA, 2010), sendo encontrados estudos em diferentes méis de melato com valores próximos ao mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) deste estudo, como relatado por Al et al., (2009), Can et al. (2015), Escuredo et al. (2013), Flores, Escuredo e Seijo (2015), Kowalski (2013) e Tuberoso et al. (2011). Apenas Giorgiana et al. (2008) relataram valores superiores aos encontrados neste estudo. Desta forma, até o momento, pode-se considerar o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) um dos méis de melato com maior teor de fenólicos totais.

Optou-se pela realização da digestão *in vitro* em misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) ao invés de cada amostra individualmente, devido especialmente ao grande número de compostos fenólicos investigados, os quais gerariam um grande volume de dados a serem tratados, sendo que o principal objetivo era avaliar o perfil do comportamento das amostras provenientes de cada região estudada, o que corrobora com o fato de que as amostras comumente são disponibilizadas comercialmente na forma de misturas de méis.

Na avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos, foram observados sob condições de digestão gástrica que padrões puros de compostos fenólicos como o ácido gálico, ácido cafeico, catequina e quercetina se mostraram satisfatoriamente estáveis a este processo (BERMUDEZ-SOTO; TOMÁS-BARBERÁN; GARCÍA-CONESA, 2007; TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Ainda, a ação do pH ácido juntamente com as enzimas digestivas são indicadas muitas vezes como os fatores responsáveis pelo aumento da concentração de alguns compostos fenólicos após a etapa de digestão gástrica (CHEN et al., 2016), possivelmente resultado da hidrólise de ligações entre compostos fenólicos e proteínas e carboidratos (SAURA-CALIXTO; SERRANO; GOÑI, 2007). Entretanto, interações entre compostos fenólicos e outros constituintes, como metais, também podem promover a diminuição da concentração de compostos fenólicos, devido a mudanças estruturais e/ou de solubilidade (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Considera-se ainda que os compostos fenólicos são sensíveis às condições alcalinas do sistema duodenal, podendo sofrer degradações ou transformações em outros compostos ou formas estruturais (CARBONELL-CAPELLA et al., 2015; CHEN et al., 2014; 2015; CILLA et al., 2011). Além disso,

componentes alimentares como minerais, proteínas, fibras, açúcares podem ser citados como possíveis elementos formadores de complexos com compostos fenólicos (CHEN et al., 2016), resultando na diminuição da bioacessibilidade dos compostos fenólicos (CARBONELL-CAPELLA et al., 2015; HELAL et al., 2014) ou também no aumento da sua bioacessibilidade (HELAL et al., 2014) pela possível ação protetora exercida pela matriz (BOBRICH et al., 2014).

Como mostrado na Tabela 3.2, a ação gerada pelas etapas de digestão *in vitro* sobre o teor de fenólicos totais se mostrou dependente da mistura de mel analisada. Para a mistura de mel de Urupema, o teor de fenólicos totais antes e após a digestão gástrica não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$), entretanto estas etapas diferiram ($p < 0,05$) da etapa duodenal, onde um decréscimo foi observado. Para a mistura de mel de Urubici, um aumento ($p < 0,05$) no teor de fenólicos totais após a etapa gástrica em relação a amostra não digerida e após a digestão duodenal foi verificado, seguido de uma queda significativa ($p < 0,05$) após a etapa duodenal diferindo da amostra não digerida e pós digestão gástrica. Para a mistura de mel de Lages, um decréscimo significativo ($p < 0,05$) foi observado para o teor de fenólicos totais após a digestão gástrica em relação a amostra não digerida e pós digestão duodenal, seguido de um novo decréscimo ao final da digestão *in vitro*, também diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) da amostra não digerida e pós digestão gástrica. Em relação a fração bioacessível após a etapa duodenal, os valores variaram de 41,07 a 74,16 %, onde a mistura de mel de Lages apresentou a menor fração bioacessível e a mistura de mel de Urupema a maior fração bioacessível relacionada ao teor de fenólicos totais. Portanto, nota-se uma perda significativa do teor de fenólicos totais ao final do processo de digestão *in vitro*, fato ligado possivelmente a sensibilidade destes compostos às condições alcalinas aplicadas na etapa duodenal (CARBONELL-CAPELLA et al., 2015; CHEN et al., 2014; 2015). Em relação a cada etapa de digestão *in vitro* (digestão gástrica e digestão duodenal) e a amostra não digerida entre as diferentes misturas de méis para o teor de fenólicos totais, percebe-se que diferentes tendências em cada etapa avaliada são verificadas para o teor de fenólicos totais dependendo da amostra analisada. É importante destacar também que estes são os primeiros estudos sobre o teor de fenólicos totais em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) antes e após a digestão gástrica e duodenal *in vitro*.

As concentrações observadas para os compostos fenólicos individuais nas misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa*

scabrella Bentham) antes e após a simulação de ambas digestões (gástrica e duodenal), são mostrados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Determinação ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de compostos fenólicos individuais em misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) antes e após a etapa gástrica e duodenal da simulação da digestão gastrointestinal (continua)

Composto fenólico	Mistura de mel de Urupema				Mistura de mel de Urubici				Mistura de mel de Lages			
	Sem digestão	Digestão gástrica	Digestão duodenal	FB*	Sem digestão	Digestão gástrica	Digestão duodenal	FB*	Sem digestão	Digestão gástrica	Digestão duodenal	FB*
Teor de fenó- licos totais *	109,6 \pm 0,971 ^a	115,9 \pm 2,671 ^a	81,27 \pm 2,290 ^b	74,16	122,6 \pm 1,342 ^b	144,4 \pm 3,621 ^a	80,63 \pm 3,770 ^c	65,75	142,0 \pm 1,640 ^a	119,7 \pm 2,493 ^b	58,30 \pm 2,621 ^c	41,07
Ácido <i>p</i> -ami- nobenzoico	< LQ	< LQ	< LQ	-	< LQ	< LQ	< LQ	-	< LQ	< LQ	< LQ	-
Ácido benzoico	118,1 \pm 17,21 ^b	114,6 \pm 13,40 ^b	225,8 \pm 29,53 ^a	191,2	184,8 \pm 6,280 ^b	182,2 \pm 6,670 ^b	381,6 \pm 51,82 ^a	206,5	1105 \pm 39,01 ^b	1021 \pm 38,68 ^b	1932 \pm 100,9 ^a	174,8
Ácido cafeico	20,42 \pm 0,590 ^a	17,76 \pm 0,830 ^b	15,97 \pm 1,300 ^b	78,21	36,44 \pm 1,250 ^a	32,34 \pm 1,100 ^b	37,15 \pm 0,880 ^a	101,9	22,26 \pm 1,280 ^a	20,63 \pm 1,110 ^a	18,89 \pm 2,560 ^a	84,86
Ácido cloro- gênico	36,06 \pm 1,990 ^a	35,84 \pm 0,680 ^a	38,81 \pm 1,220 ^a	107,6	18,96 \pm 1,680 ^a	15,89 \pm 0,540 ^a	19,96 \pm 1,300 ^a	105,3	42,54 \pm 1,590 ^a	39,53 \pm 1,900 ^a	43,41 \pm 1,860 ^a	102,0
Ácido <i>p</i> -cu- márico	38,23 \pm 0,960 ^a	31,19 \pm 0,970 ^c	34,88 \pm 1,490 ^b	91,24	41,76 \pm 1,110 ^b	37,15 \pm 0,970 ^c	45,92 \pm 0,830 ^a	110,0	36,33 \pm 1,400 ^a	29,77 \pm 0,770 ^a	34,39 \pm 4,830 ^a	94,66
Ácido 3,4- dihidroxiben- zoico	128,5 \pm 2,020 ^b	118,4 \pm 0,260 ^c	143,0 \pm 3,230 ^a	111,3	135,0 \pm 3,990 ^b	120,6 \pm 4,170 ^c	164,5 \pm 6,580 ^a	121,9	177,9 \pm 5,700 ^{ab}	160,7 \pm 3,030 ^b	200,8 \pm 17,20 ^a	112,9
Ácido ferúlico	28,94 \pm 2,200 ^a	25,00 \pm 1,460 ^a	28,85 \pm 1,300 ^a	99,69	23,21 \pm 0,400 ^b	21,92 \pm 0,870 ^b	26,37 \pm 1,120 ^a	113,6	26,98 \pm 0,620 ^a	25,64 \pm 0,340 ^a	21,94 \pm 3,660 ^a	81,32
Ácido gálico	28,21 \pm 1,840 ^a	26,35 \pm 0,940 ^a	28,87 \pm 0,480 ^a	102,3	33,55 \pm 0,150 ^{ab}	31,62 \pm 0,870 ^b	35,59 \pm 1,710 ^a	106,1	35,29 \pm 1,150 ^a	32,69 \pm 1,500 ^a	35,06 \pm 1,500 ^a	99,35
Apigenina	< LQ	< LQ	< LQ	-	< LQ	< LQ	< LQ	-	< LQ	< LQ	< LQ	-
Ácido salicí- lico	81,88 \pm 1,130 ^b	70,16 \pm 1,490 ^c	90,24 \pm 1,950 ^a	110,2	109,5 \pm 4,040 ^{ab}	100,5 \pm 2,190 ^b	120,2 \pm 5,810 ^a	109,7	201,8 \pm 6,500 ^{ab}	188,6 \pm 5,180 ^b	220,4 \pm 11,71 ^a	109,2
Ácido siná-pico	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-
Ácido sirín-gico	14,92 \pm 0,990 ^a	12,47 \pm 0,530 ^a	15,99 \pm 2,720 ^a	107,2	35,35 \pm 0,540 ^{ab}	33,37 \pm 0,670 ^b	40,56 \pm 4,540 ^a	114,7	51,10 \pm 5,220 ^a	42,30 \pm 1,820 ^a	46,64 \pm 3,310 ^a	91,27
Ácido vanílico	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-
Catequina	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-
Coniferaldeído	9,040 \pm 1,300 ^a	9,970 \pm 1,730 ^a	12,32 \pm 0,880 ^a	136,3	< LQ	< LQ	< LQ	-	< LQ	< LQ	< LQ	-
Crisina	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LQ	< LQ	< LQ	-

Tabela 3.3 – Determinação ($\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de compostos fenólicos individuais em misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) antes e após a etapa gástrica e duodenal da simulação da digestão gastrointestinal (conclusão)

Composto fenólico	Mistura de mel de Urupema				Mistura de mel de Urubici				Mistura de mel de Lages			
	Sem digestão	Digestão gástrica	Digestão duodenal	FB*	Sem digestão	Digestão gástrica	Digestão duodenal	FB*	Sem digestão	Digestão gástrica	Digestão duodenal	FB*
Epicatequina	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-
Galangina	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LQ	< LQ	< LQ	-
Epigallocate- quina galato	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-
Hesperidina	< LD	< LD	< LD	-	1,890±0,160 ^b	1,640±0,120 ^b	2,99 ±0,130 ^a	158,2	18,06 ±1,060 ^b	18,47±0,840 ^b	21,89±1,930 ^a	121,2
Isoramnetina	10,64±0,420 ^a	8,170±0,130 ^b	8,530±0,720 ^b	80,17	8,730±0,330 ^a	7,370±0,140 ^b	8,540±0,860 ^{ab}	97,82	10,47 ±0,660 ^a	8,990±0,080 ^a	10,48±1,590 ^a	100,1
Kaempferol	17,38±0,370 ^a	15,21±0,780 ^b	13,64±0,950 ^b	78,48	18,17±1,250 ^a	14,85±0,780 ^a	15,64±2,090 ^a	86,08	18,37±0,750 ^a	16,59±1,510 ^a	15,85±2,200 ^a	86,28
Luteolina	9,740±0,990 ^a	8,570±0,600 ^a	8,530±0,710 ^a	87,58	8,720±1,410 ^a	7,440±0,550 ^a	7,330±1,100 ^a	84,06	6,540±0,850 ^a	6,760±0,170 ^a	6,440±0,180 ^a	98,47
4-metilumbe- liferona	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-
Naringenina	3,410±0,260 ^a	3,270±0,370 ^a	3,210±0,570 ^a	94,13	5,780±0,570 ^a	5,120±0,080 ^a	5,550±0,990 ^a	96,02	1,820±0,240 ^{ab}	1,710±0,160 ^b	2,310±0,250 ^a	126,9
Naringina	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-
Pinobanksin	3,870±0,240 ^a	3,510±0,250 ^a	3,640±0,490 ^a	94,06	6,640±0,550 ^a	6,260±0,590 ^a	6,070±0,480 ^a	91,42	2,860±0,380 ^a	2,320±0,060 ^a	2,860±0,230 ^a	100,0
Pinocembrin	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	3,030±0,030 ^a	3,410±0,320 ^a	3,180±0,120 ^a	105,0
Quercetina	16,46± 0,910 ^a	13,11 ± 1,220 ^a	14,00 ± 1,900 ^a	85,05	26,23±0,950 ^a	21,52±0,670 ^b	23,38±2,940 ^{ab}	89,13	48,99±1,740 ^a	45,37±3,510 ^a	50,05±1,200 ^a	102,2
Rutina/ composto desconhecido	9,940±0,740 ^a	9,940±0,290 ^a	10,57±0,620 ^a	106,3	9,640±0,800 ^a	9,750±0,420 ^a	10,28±0,770 ^a	106,6	38,20±0,530 ^b	36,66±2,170 ^b	42,31±1,320 ^a	110,8
Sinapaldeído	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-	< LD	< LD	< LD	-
Siringaldeído	< LQ	< LQ	< LQ	-	< LQ	< LQ	< LQ	-	2,800±0,420 ^b	2,910±0,110 ^b	4,880±0,190 ^a	174,3
Somatória	575,7	523,5	696,8	121,0	704,4	649,5	951,6	135,1	1850	1704	2713	146,7

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão; LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação; ^{a-c} Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna, para a mesma mistura de mel, representam diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey; FB* – fração bioacessível em relação a etapa duodenal; (-) não aplicado; * mg EAG 100g⁻¹ de mel.

Fonte: Próprio autor (2015).

De acordo com os valores mostrados na Tabela 3.3 para as amostras não digeridas, observa-se que os compostos fenólicos ácido sinápico, ácido vanílico, catequina, epicatequina, epigallocatequina galato, 4-metilumbeliferona, naringina e sinapaldeído não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. O ácido *p*-aminobenzoico e apigenina apresentaram valores a baixo do LQ em todas as misturas de méis, enquanto que a crisina e a galangina foram somente detectadas (valores a baixo do LQ) na mistura de mel de Lages. Foram determinados em todas as misturas de méis não dieridos os compostos fenólicos: ácido benzoico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido siríngico, isoramnetina, kaempferol, luteolina, naringenina, pinobanksin, quercetina e rutina/composto desconhecido. O coniferaldeído foi determinado apenas na mistura de mel de Urupema e detectado nas demais misturas de mel, enquanto que a hesperidina não foi detectada na mistura de mel de Urupema, porém, foi quantificada nas demais misturas de mel. O pinocembrin e o siringaldeído foram quantificados apenas na mistura de mel de Lages. Observa-se também que os compostos fenólicos determinados mais abundantes nas misturas de mel analisadas foram os ácidos benzoico, 3,4-dihidroxibenzoico e salicílico, com destaque para o ácido benzoico encontrado na mistura de mel de Lages, o qual apresentou o valor de $1105 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$. Ainda, a mistura de mel de Lages apresentou a maior somatória dos compostos fenólicos individuais em relação as demais misturas de méis.

Em estudos relacionados a méis de melato de diferentes origens, observa-se uma notável variação de resultados para um mesmo composto, a qual pode ser resultado de um conjunto de fatores como o preparo de amostra empregado e a origem do mel de melato analisado. Os ácidos benzoicos, 3,4-dihidroxibenzoico e salicílico, dependendo do estudo, também foram um dos compostos fenólicos majoritários encontrados em diferentes méis de melato (CAN et al., 2015; DAHER; GÜLAÇAR, 2008; HAROUN et al., 2012), com destaque para o ácido protocatecuico ($74460 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) relatado por Can et al. (2015), o qual apresentou valor superior aos encontrados neste estudo. Para a apigenina, Lachmann et al. (2010a) não detectaram este fenólico em amostras de méis de melato de diferentes fontes, sendo que neste estudo este analito foi detectado em todas as misturas de mel analisadas. Para a crisina, foram encontrados em diferentes méis de melato valores superiores (DAHER; GÜLAÇAR, 2008; HAROUN et al., 2012; LACHMANN et al., 2010a), ao encontrado na mistura de mel de Lages,

enquanto que este analito não foi detectado nos estudos de Silici, Sarioglu e Karaman (2014) e Socha et al. (2011) e nas demais misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) deste estudo. Os valores encontrados neste trabalho para o ácido *p*-cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico e quercetina podem ser considerados superiores os observados por Haroun et al. (2012). Socha et al. (2011), que relataram ainda valores inferiores aos encontrados nas misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) para o ácido clorogênico e naringenina, enquanto que para a quercetina e kaempferol, os valores obtidos foram próximos aos observados neste estudo.

Como apresentado na Tabela 3.3, não foram identificados em nenhuma mistura de méis analisadas ao longo o processo de digestão *in vitro* os compostos fenólicos: epicatequina, catequina, ácido vanílico, 4-metilumberliferona, sinapaldeído, ácido sinápico, epigallocatequina galato e naringina. O ácido *p*-aminobenzoico, apigenina, crisina e galangina apresentaram a mesma tendência observada para as misturas de méis não digeridos. O ácido benzoico, siringaldeído e hesperidina, nas misturas de méis em que foram quantificados, se mostraram estáveis à etapa gástrica sofrendo um aumento significativo ($p < 0,05$) ao final da etapa duodenal, em comparação as amostras não digeridas e pós digestão gástrica. Assim, pode-se considerar que estes compostos têm a sua bioacessibilidade aumentada ao final do processo de digestão, apresentando uma fração bioacessível variando de 174,8 – 206,5 % para o ácido benzoico, de 121,2 – 158,2 % para a hesperidina e de 174,3 % para o siringaldeído. Os compostos pinocembrin, luteolina, ácido clorogênico, coniferaldeído e pinobanksin nas misturas de méis em que foram quantificados, não sofreram ação do sistema gastrointestinal indicando serem estáveis a todo o processo de digestão *in vitro* sem sofrerem alterações na sua bioacessibilidade. Portanto, a fração bioacessível encontrada para estes compostos nas misturas de mel foram de 105,0 % para o pinocembrin, 84,06 – 98,47 % para a luteolina, 102,0 – 107,6 % para o ácido clorogênico, 136,3 % para o coniferaldeído e 91,42 – 100,0 % para o pinobanksin.

Para os demais compostos fenólicos, na mistura de mel de Urupema, observou-se que os ácidos ferúlico, gálico, siríngico, além da naringenina, quercetina e rutina/composto desconhecido se apresentaram estáveis ao processo de digestão *in vitro*, enquanto que para os ácidos 3,4-dihidroxibenzoico e salicílico um aumento na sua bioacessibilidade ao final da digestão *in vitro* foi verificada (111,3 e 110,2 %, respectivamente). Ainda, uma queda na bioacessibilidade dos compostos ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, isoramnetina e kaempferol,

ao final da digestão *in vitro* foi verificada, apresentando uma fração bioacessível de 78,21, 91,24, 80,17 e 78,48 %, respectivamente. Este fato pode estar relacionado a possíveis alterações estruturais, oxidação e/ou polimerização destes compostos fenólicos estimulados pelas condições alcalinas do sistema duodenal (BERMUDEZ-SOTO; TOMÁS-BARBERÁN; GARCÍA-CONESA, 2007; CHEN et al., 2016). Apenas para os ácidos *p*-cumárico, 3,4-dihidroxibenzoico e salicílico uma queda acentuada ($p < 0,05$) após a etapa gástrica em relação a amostra não digerida e pós digestão duodenal foi observada, enquanto que quase todos os demais compostos citados, como ácido ferúlico, ácido gálico, quercetina, naringenina, se mostraram estáveis a esta etapa da digestão *in vitro*. Para a mistura de mel de Urubici, os compostos ácido cafeico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido sirínico, isoramnetina, kaempferol, naringenina, quercetina e rutina/composto desconhecido não tiveram a sua bioacessibilidade afetada ao final do processo de digestão *in vitro*, enquanto que para os ácidos *p*-cumárico, 3,4-dihidroxibenzoico e ferúlico, um aumento ao final da digestão *in vitro* foi verificado, obtendo-se uma fração bioacessível de 110,0, 121,9 e 113,6 %, respectivamente. Nota-se também que alguns compostos como o ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido sirínico apresentaram uma queda significativa ($p < 0,05$) após a etapa gástrica em relação a etapa duodenal. Para a mistura de mel de Lages, os ácidos cafeico, *p*-cumárico, 3,4-dihidroxibenzoico, ferúlico, gálico, salicílico e sirínico, além da isoramnetina, kaempferol, naringenina e quercetina não tiveram a sua bioacessibilidade afetada ao final da simulação da digestão. Apenas a rutina/composto desconhecido apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) da sua bioacessibilidade ao final do processo de digestão *in vitro*, onde a sua fração bioacessível foi de 110,8 %. Ainda, a maior parte dos compostos fenólicos citados, como a isoramenetina, quercetina, os ácidos *p*-cumárico, cafeico, gálico, ferúlico se mostraram estáveis ao processo de digestão gástrica, não diferindo estatisticamente da amostra não digerida e pós digestão duodenal. Apesar da diminuição da bioacessibilidade ao final da simulação da digestão para alguns compostos fenólicos na mistura de mel de Urupema, a fração bioacessível final, obtida a partir da somatória dos compostos individuais, foi de 121,0 %, enquanto que para as misturas de mel de Urubici e Lages, as frações bioacessíveis finais foram de 135,1 e 146,7 %, respectivamente. Assim, na mistura de mel de Lages foi quantificado o maior número de compostos fenólicos (19 compostos) em relação as demais misturas de méis (17 compostos). Ainda, como verificado nas misturas de méis antes da digestão, os

compostos majoritários após a digestão gástrica e duodenal foram o ácido benzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e o ácido salicílico.

Portanto, os compostos fenólicos individuais pesquisados nas misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) se mostram altamente bioacessíveis, apresentando uma fração bioacessível variando de 78,21 – 206,5 %, mesma tendência de aumento percebida quando se relaciona à soma dos compostos fenólicos individuais ao final da simulação da digestão para todas as misturas de méis avaliados. Ainda, é importante ressaltar que estes são os primeiros relatos do comportamento de compostos fenólicos individuais ao longo do processo de simulação da digestão em amostras de méis.

Em relação a origem geográfica das misturas de méis analisadas, nota-se que as três cidades (Lages, Urubici e Urupema) situam-se próximas, porém, Lages está localizada mais ao oeste do estado de Santa Catarina além de apresentar a menor altitude em relação as demais cidades. Estes fatores podem implicar em condições climáticas e ambientais diferentes das demais cidades, as quais podem afetar diretamente a composição química do mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham), contribuindo para que maiores valores do teor de fenólicos totais e da somatória dos fenólicos individuais fossem verificadas para a mistura de mel de Lages não digerido. Ainda, em todas as misturas de méis analisadas, referentes às amostras antes e ao longo da digestão *in vitro* (etapa gástrica e duodenal), nota-se que os valores encontrados para o teor de fenólicos totais foram sempre superiores ao valor encontrado para a somatória dos compostos fenólicos individuais. Este fato pode estar relacionado ao mecanismo de reação envolvido no método de Folin-Ciocalteu, o qual baseia-se na capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu, em meio alcalino, promovido principalmente por diversas classes de compostos fenólicos (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; MAGALHÃES et al., 2008), mas também por outras substâncias redutoras como ácido ascórbico, aminas aromáticas e açúcares (KHODDAMI; WIKES; ROBERTS, 2013). Além disso, o método aplicado para a determinação de compostos fenólicos individuais pode não ter contemplado a presença de outros compostos fenólicos presentes nas amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) avaliadas.

A capacidade antioxidante *in vitro* para as três misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) antes e após os procedimentos de digestão (gástrica e duodenal) *in vitro* foram avaliados a partir de dois métodos espectrofotométricos, sendo os valores apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Efeito da digestão *in vitro* sobre a capacidade antioxidante *in vitro* em misturas de méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)

Mistura de mel	Etapa da digestão	Atividade antioxidante			
		FRAP		DPPH	
		$\mu\text{mol Fe}^{+2} 100 \text{ g}^{-1}$ de mel	FB	$\text{mg EAA } 100 \text{ g}^{-1}$ de mel	FB
Urupema	Sem digestão	547,2 \pm 22,31 ^{aB}	-	31,02 \pm 0,342 ^{aB}	-
	Digestão gástrica	572,8 \pm 21,24 ^a	104,7 ^A	17,44 \pm 0,264 ^b	56,22 ^A
	Digestão duodenal	410,3 \pm 18,31 ^b	74,98 ^B	31,28 \pm 0,441 ^a	100,8 ^A
Urubici	Sem digestão	620,1 \pm 4,111 ^{aA}	-	38,10 \pm 0,240 ^{aA}	-
	Digestão gástrica	626,3 \pm 23,48 ^a	101,0 ^A	21,24 \pm 2,510 ^c	55,75 ^A
	Digestão duodenal	559,4 \pm 2,120 ^b	90,20 ^A	33,89 \pm 1,391 ^b	88,95 ^B
Lages	Sem digestão	612,1 \pm 8,332 ^{abA}	-	38,27 \pm 1,160 ^{aA}	-
	Digestão gástrica	661,9 \pm 29,82 ^a	108,1 ^A	19,25 \pm 0,603 ^c	50,30 ^A
	Digestão duodenal	564,7 \pm 8,382 ^b	92,25 ^A	30,08 \pm 0,762 ^b	78,60 ^C

Legenda: FB – fração bioacessível; Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ^{a-c} Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna, para a mesma mistura de mel, representam diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey; ^{A-C} Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna, entre diferentes misturas de mel na mesma etapa da digestão, representam diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey; EAA – equivalente a ácido ascórbico; (-) não aplicado.

Fonte: Próprio autor (2015).

Em relação aos métodos apresentados na Tabela 3.4, sabe-se que o mecanismo envolvido na avaliação da capacidade antioxidante pelo método FRAP baseia-se na capacidade de compostos antioxidantes presentes na amostra em reduzir o complexo Fe^{+3} -(TPTZ), presente no reagente FRAP, a $[\text{Fe}^{+2}\text{-(TPTZ)}_2]^{+2}$ (BERTONCELJ et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008) em meio ácido. Enquanto que o método de desativação de radicais DPPH permite investigar de maneira global a atividade de transferência de elétron/átomo de hidrogênio de compostos (BERETTA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2008) não sendo específico a um tipo de antioxidante (MEDA et al., 2005).

Para as misturas de méis não digeridos, a capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP variou de 547,2 – 620,1 $\mu\text{mol Fe}^{+2} 100 \text{ g}^{-1}$, onde a mistura de mel de Urupema apresentou estatisticamente ($p < 0,05$) a menor capacidade antioxidante em relação as demais misturas de mel, os quais não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si. Em comparação com outros estudos realizados em méis de melato encontrados na literatura, as amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) não digeridas apresentaram, por este método, valores superiores aos relatados por Can et al. (2015) os quais variaram de 86 a 148 $\mu\text{mol Fe}^{+2} 100 \text{ g}^{-1}$, e inferiores aos relatados por

Tuberoso et al. (2011) ($1260 \mu\text{mol Fe}^{+2} 100 \text{ g}^{-1}$) e Jerkovic e Marijanovic (2010) (480 e $1610 \mu\text{mol Fe}^{+2} 100 \text{ g}^{-1}$).

Para a capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH, os valores encontrados para as misturas de mel não digeridos variaram de $31,02 - 38,27 \text{ mg EAA } 100 \text{ g}^{-1}$, onde novamente a mistura de mel de Urupema apresentou estatisticamente ($p < 0,05$) a menor capacidade antioxidante em relação as demais misturas de mel, os quais não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si. Considerando-se os limitados dados disponíveis na literatura para méis de melato de diferentes origens expressos como equivalente a ácido ascórbico para a capacidade antioxidante determinada por este método, nota-se que as amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) não digeridas apresentaram valores próximos aos relatados por Meda et al. (2005) ($24,8$ a $32,4 \text{ mg EAA } 100 \text{ g}^{-1}$) e Lachman et al. (2010b) ($37,6$ a $44,2 \text{ mg EAA } 100 \text{ g}^{-1}$).

Ao longo do processo de digestão *in vitro*, sabe-se que possíveis alterações estruturais em compostos antioxidantes podem gerar metabólitos com diferentes reações frente a diferentes ensaios da capacidade antioxidante (WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011). Ainda, para diferentes matrizes alimentares como frutas e sucos, comportamentos diferenciados para a capacidade antioxidante, após as etapas de digestão *in vitro*, são justificados pelas características próprias das matrizes alimentares e possíveis interações principalmente entre compostos fenólicos, mas também aminoácidos, proteínas e outros, como enzimas e outros constituintes do alimento (HELAL et al., 2014; KAMILOGLU et al., 2015; WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011).

Em relação a bioacessibilidade *in vitro*, como mostrado na Tabela 3.4, a capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP para as misturas de mel de Urupema e Urubici sofreram uma queda significativa ($p < 0,05$) ao final do processo de digestão *in vitro* em relação as amostras não digeridas e pós digestão gástrica, as quais não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si. Apenas para a mistura de mel de Lages foi observado que a amostra não digerida não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das demais etapas da digestão *in vitro* (gástrica e duodenal), porém, uma queda significativa ($p < 0,05$) ao final da simulação a digestão foi verificada em relação a etapa gástrica. Assim, a fração bioacessível em relação ao final da digestão *in vitro* variou de $74,98$ a $92,25 \%$, onde o menor valor foi verificado para a mistura de mel de Urupema e o maior valor para a mistura de mel de Lages. Com relação a cada etapa de digestão *in vitro* (digestão gástrica e digestão duodenal) e a amostra não digerida entre as diferentes misturas

de méis para a capacidade antioxidante pelo método FRAP, percebe-se que uma tendência muito similar foi mantida entre as diferentes etapas da digestão, independente da amostra analisada.

Para a capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH nas diferentes misturas de méis ao longo da digestão *in vitro*, nota-se que para a mistura de mel de Urupema uma queda significativa ($p < 0,05$) foi verificada após a etapa gástrica em relação a amostra não digerida e pós digestão duodenal, as quais não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si. Para as misturas de méis de Urubici e Lages, uma queda significativa ($p < 0,05$) foi verificada após a etapa gástrica em relação a amostra não digerida e a amostra após a digestão duodenal, seguido de um aumento significativo ($p < 0,05$) da capacidade antioxidante ao final da simulação da digestão *in vitro* em relação a amostra não digerida e pós gástrica, porém, ainda estatisticamente ($p < 0,05$) inferior ao valor encontrado para a amostra não digerida. Assim, apesar da fração bioacessível relacionada a etapa gástrica ter sido baixa, variando de 50,30 – 56,22 %, uma elevação foi verificada ao final da digestão *in vitro*, variando de 78,60 – 100,8 %, onde a maior fração bioacessível foi notada para a mistura de mel de Urupema e a menor para a mistura de mel de Lages. Em relação a cada etapa de digestão *in vitro* (digestão gástrica e digestão duodenal) e a amostra não digerida entre as diferentes misturas de méis para a capacidade antioxidante pelo método DPPH, percebe-se que diferentes tendências em cada etapa avaliada são verificadas dependendo da amostra analisada, comportamento não observado para a capacidade antioxidante pelo método FRAP.

Portanto, pode-se considerar que a capacidade antioxidante total do mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) sofre uma redução significativa ($p < 0,05$) ao final do processo de digestão *in vitro*, fato que pode estar relacionado à ação da condição alcalina sobre compostos com atividade antioxidante gerando possíveis transformações estruturais que acarretam por consequência na alteração da capacidade antioxidante (CHEN et al., 2016). Entretanto, as perdas na capacidade antioxidante total ao final do processo de simulação da digestão foram inferiores a 30%, o qual permite afirmar que o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) apresenta capacidade antioxidante *in vitro* considerável ao final do processo de digestão *in vitro*. É importante destacar ainda que estes são os primeiros estudos sobre a capacidade antioxidante *in vitro* em méis de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) bem como sobre o seu comportamento frente as condições de digestão *in vitro*.

Até o momento, apenas o estudo realizado por O'Sullivan et al. (2013) avaliou o efeito da simulação da digestão em amostras de méis sobre a capacidade antioxidante *in vitro* e o teor de fenólicos totais. Os méis avaliados foram dois méis comerciais (Tesco e LIDL) adquiridos no comércio local da Irlanda, além de um mel 100% irlandês e um mel de manuka (*Leptospermum scoparium*). O procedimento de digestão *in vitro* aplicado consistiu basicamente da digestão gástrica das amostras utilizando pepsina e pH reacional de aproximadamente 2, sendo o sistema mantido sob agitação por 1 h a 37 °C. Em seguida, as amostras foram submetidas a digestão duodenal, onde foram utilizados sais biliares e pancreatina. O pH do sistema foi ajustado para 7,4 e mantido sob agitação por 2 h a 37 °C. Nota-se assim que o tempo de digestão adotado na etapa gástrica da digestão das amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) deste estudo foi maior (2 h) e o pH reacional adotado na etapa duodenal foi menor ($6,3 \pm 0,2$). Outra diferença entre os protocolos foi a concentração das soluções enzimáticas e de sais biliares. Com relação ao teor de fenólicos totais nas amostras avaliadas por O'Sullivan et al. (2013), não houve diferença estatística entre as amostras de mel antes e após a digestão *in vitro*, fato não verificado para as amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) analisadas, onde uma queda significativa ($p < 0,05$) foi observada ao final da simulação da digestão. Este fato pode estar ligado as diferenças entre os protocolos de digestão *in vitro* bem como à origem botânica de cada mel. Em relação a capacidade antioxidante pelo método FRAP, um decréscimo significativo ($p < 0,05$) após a digestão *in vitro* foi verificada apenas nos méis Tesco e de manuka, enquanto que pelo método DPPH todas as amostras de mel analisadas sofreram um decréscimo significativo ($p < 0,05$) ao final da digestão *in vitro* (O'SULLIVAN et al., 2013). Pode-se considerar que a mesma tendência foi verificada para as amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) avaliadas neste estudo. O'Sullivan et al. (2013) destacam que o efeito da digestão *in vitro* sobre a capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais é dependente de um grande número de fatores incluindo a matriz alimentar, os quais podem promover, portanto, tendências distintas no teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante entre diferentes méis.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram avaliados o teor de fenólicos totais, compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante *in vitro* em

misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) antes e após a digestão gástrica e duodenal *in vitro*.

Para o teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante mensurada pelos métodos FRAP e DPPH ao final da digestão *in vitro*, observou-se que estes apresentaram-se sensíveis a condição alcalina da etapa duodenal, tendência contrária ao verificado para os compostos fenólicos individuais, os quais se mostraram potencialmente bioacessíveis ao final da simulação da digestão.

Portanto, pode-se concluir que mesmo quando submetido a condições de simulação da digestão, o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) apresenta capacidade antioxidante total satisfatória, uma vez que perdas inferiores a 30% foram verificadas, além de compostos fenólicos individuais pesquisados notavelmente bioacessíveis.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste estudo foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação de compostos fenólicos em LC-ESI-MS/MS utilizando como preparo de amostra uma simples diluição. O método apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros faixa de trabalho e linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade e limites de detecção e quantificação, além de não ser evidenciado efeito de matriz, se mostrando adequado para aplicação em amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Ainda, a partir da digestão *in vitro* aplicada em misturas de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), foi possível a determinação da fração bioacessível do teor de compostos fenólicos totais, compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante total, antes e após a digestão *in vitro* gástrica e duodenal.

Como futuros estudos, a identificação do composto desconhecido de mesma massa molar do ácido salicílico e do composto co-eluído com a rutina encontrados em amostras de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) podem ser realizados. Ainda, o estudo da bioacessibilidade *in vitro* de outros constituintes do mel, como aminoácidos, proteínas, minerais, podem contribuir para uma melhor elucidação das suas influências sobre a capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais deste mel ao longo do processo de digestão (gástrica e duodenal) *in vitro*. Somado a isso, a significativa bioacessibilidade *in vitro* de grande parte dos compostos fenólicos pesquisados aliado à capacidade antioxidante *in vitro* satisfatória ao final do processo de simulação da digestão apresentado pelo mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), estimulam a realização de futuros estudos *in vivo* visando um melhor esclarecimento do comportamento destes compostos e outros constituintes do mel, bem como da capacidade antioxidante desta amostra.

Assim, este estudo contribui com dados inéditos na caracterização e quantificação de compostos fenólicos individuais em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), além de fornecer informações sobre a bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos e capacidade antioxidante desta matriz pouco estudada e conhecida na região, porém em crescente valorização no mercado internacional.

REFERÊNCIAS

- AL, M. L. et al. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 112, p. 863–867, 2009.
- ALMINGER, M. et al. *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S.l.], v. 13, p. 413–436, 2014.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, [S.l.], v. 3, p. 15–23, 2010.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M. Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. **Current Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 20, p. 621–638, 2013.
- ANGELI, A. *Mimosa scabrella* (Bracatinga). **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**. 2003. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/mimosa.scabrella.asp>>. Acesso em: 12 maio 2015.
- A-RAHAMAN, N. L. et al. Physicochemical and radical scavenging activities of honey samples from Malaysia. **Agricultural Sciences**, [S.l.], v. 4, p. 46–51, 2013.
- ARRÁEZ-ROMÁN, D. et al. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by Capillary Electrophoresis–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.l.], v. 41, p. 1648–1656, 2006.
- BARTH, O. M. **Análise polínica de mel: avaliação de dados e seu significado**. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/81/artigo.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

BEER, D.; JOUBERT, E. Development of HPLC method for *Cyclopia subternata* phenolic compound analysis and application to other *Cyclopia* spp.. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S.l.], v. 23, p. 289–297, 2010.

BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, [S.l.], v. 15, p. 285–292, 2004.

BENDER, C. M.; PEREIRA, L. B.; SOUZA, J. P. **Estudo da competitividade da cadeia produtiva apícola de Santa Catarina: ênfase na análise da dinâmica competitiva do segmento produtor e processador da cadeia**. Disponível em: <http://www.apec.unesc.net/I%20EEC/sessoes_tematicas/Rural_agricola/artigo3a.PDF>. Acesso em: 24 jun. 2015.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 239, p. 239, 70–76, 1996.

BERETTA, G. et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 533, p. 185–191, 2005.

BERMÚDEZ-SOTO, M.-J.; TOMÁS-BARBERÁN, M.-T.; GARCÍA-CONESA, F.-A. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 102, p. 865–874, 2007.

BERTIN, R. et al. Nutrient composition and, identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, [S.l.], v. 55, p. 404–411, 2014.

BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 105, p. 822–828, 2007.

BERTONCELJ, J. et al. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 127, p. 296–302, 2011.

BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 136, p. 46–54, 2013.

BLAINSKI, A. et al. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, [S.l.], v. 18, p. 6852–6865, 2013.

BOBRICH, A. et al. Phytochemicals in Japanese plums: impact of maturity and bioaccessibility. **Food Research International**, [S.l.], v. 65, p. 20–26, 2014.

BOGDANOV, S. et al. Honey for nutrition and health: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, [S.l.], v. 27, p. 677–689, 2008.

BORGES, G. S. C. et al. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, [S.l.], v. 51, p. 363–369, 2013.

BOUAYED, J.; BOHN, T. **Nutrition, well-being and health**. 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

BRAGA, L. S. et al. **Plantas apícolas nativas da região de Campo Mourão-PR**. Disponível em: <http://www.sei.utfpr.edu.br/sei_anais/trabalhos/comunicacao_oral/Sala%20D/PLANTAS%20AP%C3%8DCOLAS%20NATIVAS%20DA%20REGI%C3%83O%20DE%20CAMPO%20MOUR%C3%83O-PR.pdf>. Acesso em: 22 set. 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 28, p. 25–30, 1995.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, 2003.

BRASIL. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos.** Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. Revisão 04, 2011a.

BRASIL, MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000.** Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. 2000.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários.** Brasília (DF): Mapa/ACS, 2011b.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, Kantvik, v. 128, p. 93-106, 1998.

BUENO-COSTA, F. M. et al. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 65, p. 333–340, 2016.

CAMPOS, G. et al. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 1-5, 2003.

CAN, Z. et al. An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 180, p. 133–141, 2015.

CAO, J. et al. Physicochemical characterisation of four cherry species (*Prunus* spp.) grown in China. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 173, p. 855–863, 2015.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds

from fruits and vegetables: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S.l.], v. 13, 2014.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 184, p. 122–130, 2015.

CARPANEZZI, A. A. et al. **Manual técnico da bracinga** (*Mimosa scabrella* Benth). 1988. Disponível em:
<<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/seriedoc/edicoes/doc20.pdf>>. Acesso em: 8 jul. 2015.

CARRATÙ, B. et al. Free amino acids, oxalate and sulphate for honey characterization. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, [S.l.], v. 3, p. 81-88, 2011.

CARVALHO, P. E. R. **Bracinga**. Embrapa Florestas, Circular Técnica, n. 59. 2002. Disponível em:
<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/42011/1/CT0059.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. São Paulo (SP): Agronômica Ceres, 2005.

CHAMORRO, F. J.; NATES-PARRA, G.; KONDO, T. Mielato de *Stigmacoccus asper* (Hemiptera: Stigmacoccidae): recurso melífero de bosques de roble en Colombia. **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 39, p. 61-70, 2013.

CHEN, G.-L. et al. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. **Industrial Crops and Products**, [S.l.], v. 57, p. 150–157, 2014.

CHEN, G.-L. et al. Total phenolic, flavonoid and antioxidante activity of 23 edible flowers subjected to *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, [S.l.], v. 17, p. 243–259, 2015.

CHEN, G.-L. et al. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, [S.l.], v. 20, p. 317–331, 2016.

CHUA, L. S.; ADNAN, N. A. Biochemical and nutritional components of selected honey samples. **ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, [S.l.], v. 13, p. 169–179, 2014.

CHUA, L. S.; LEE, J. Y.; CHAN, G. F. Honey protein extraction and determination by Mass Spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.l.], v. 405, p. 3063–3074, 2013.

CILLA, A. et al. Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S.l.], v. 24, p. 87–94, 2011.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3. ed. atual. e ampl. Barueri (SP): Manole, 2009.

DAGLIA, M. et al. Influence of *in vitro* simulated gastroduodenal digestion on methylglyoxal concentration of manuka (*Lectospermum scoparium*) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 61, p. 2140–2145, 2013.

DAHER, S.; GÜLAÇAR, F. O. Analysis of phenolic and other aromatic compounds in honeys by solid-phase microextraction followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 56, p. 5775–5780, 2008.

DAHMER, N. et al. “Bracatinga” (*Mimosa scabrella* Benth), a multipurpose tree growing in Southern Brazil: chromosome number and genetic variation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, [S.l.], v. 60, p. 377–383, 2013.

DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 552, p. 25–35, 2005.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression II. **Biometrika**, [S.l.], v. 38, p. 159–178, 1951.

ENGSTRÖM, M. T.; PÄLIJÄRVI, M.; SALMINEN, J.-P. Rapid fingerprint analysis of plant extracts for ellagitannins, gallic acid, and quinic acid derivatives and quercetin-, kaempferol- and myricetin-based flavonol glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 63, p. 4068–4079, 2015.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; WAHAB, M. S. A. Honey: A Novel Antioxidant. **Molecules**, [S.l.], v. 17, p. 4400–4423, 2012.

ESCRICHE, I. et al. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey: impact of industrial thermal treatment. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 142, p. 135–143, 2014.

ESCUREDO, O. et al. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 138, p. 851–856, 2013.

ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in Physiology**, [S.l.], v. 3, p. 1–22, 2012.

EURACHEM. **Eurachem guide**: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. 2014. Disponível em: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2015.

EUROPEAN COMMISSION. European Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Communities**, p. 8–36, 2002.

FLORES, M. S. R.; ESCUREDO, O.; SEIJO, M. C. Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrenaica* honeydew honeys. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 166, p. 101–106, 2015.

GHELDOLF, N.; WANG, X.-H.; ENGESETH, N. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 51, p. 1500–1505, 2003.

GIORGIANA, S. O. et al. Correlation between the phenolic content and antioxidant capacity of declared honeydew honeys produced in Transylvania. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, [S.l.], v. 65, p. 1-2, 2008.

GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Echnometrics**, [S.l.], v. 11, p. 1-21, 1969.

HAJAJI, H. E. et al. Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties of carob tree leaves from Morocco. **Records of Natural Products**, [S.l.], v. 4, p. 193-204, 2010.

HAROUN, M. I. et al. Phenolic acids and flavonoids profiles of some Turkish honeydew and floral honeys. **Journal of Food Technology**, [S.l.], v. 10, p. 39-45, 2012.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro (RJ): LTC, 2012.

HE, Q.; LV, Y.; YAO, K. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 101, p. 1178-1182, 2006.

HELAL, A. et al. Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to *in vitro* gastro-pancreatic digestion. **Journal of functional Foods**, [S.l.], v. 7, p. 506-516, 2014.

HELENO, S. A. et al. Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 63, p. 799-806, 2015.

HUR, S. J. et al. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 125, p. 1-12, 2011.

HUSSEIN, S. Z. et al. Gelam honey attenuates carrageenan-induced rat paw inflammation via NF-kB pathway. **PLOS ONE**, [S.l.], v. 8, 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. 41. ed. Rio de Janeiro (RJ): IBGE, 2013.

JERKOVIĆ, I.; MARIJANOVIĆ, Z. Oak (*Quercus frainetto* Ten.) honeydew honey—approach to screening of volatile organic composition and antioxidant capacity (DPPH and FRAP Assay). **Molecules**, [S.l.], v. 15, p. 3744-3756, 2010.

KAMILOGLU, S. et al. Influence of different processing and storage conditions on *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 186, p. 74–82, 2015.

KAROUI, R. et al. The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 101, p. 314-323, 2007.

KHALIL, M. I. et al. Content and antioxidant properties of processed tualang honey (Agromas®) collected from different regions in Malaysia. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 4, p. 214-219, 2012.

KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; BOUKRRA, L. Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. **The Open Nutraceuticals Journal**, [S.l.], v. 3, p. 6-16, 2010.

KHODDAMI, A.; WIKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compound. **Molecules**, [S.l.], v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KIM, D.; LEE, K.; LEE, H.; LEE, C. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 50, p. 3713–3717, 2002.

KOSINSKA-CAGNAZZO, A. et al. Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in *in vitro* digestion/Caco-2 absorption model. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 170, p. 288–294, 2015.

KOWALSKI, S. Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 141, p. 1378–1382, 2013.

KRUIVE, A. et al. Tutorial review on validation of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 870, p. 29–44, 2015a.

KRUIVE, A. et al. Tutorial review on validation of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 870, p. 8–28, 2015b.

LACHMAN, J. et al. Contents of major phenolic and flavonoid antioxidants in selected Czech honey. **Czech Journal of Food Sciences**, [S.l.], v. 28, p. 412–426, 2010a.

LACHMAN, J. et al. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 43, p. 52–58, 2010b.

LANGOS, D. et al. Development of stable isotope dilution assays for the quantitation of free phenolic acids in wheat and barley and malts produced thereof. **European Food Research and Technology**, [S.l.], v. 241, p. 637–645, 2015.

LEVENE, H. **Robust test for equality of variances**. Palo Alto (California): Stanford University Press, 1960. p. 278-292.

LIMA, J. R.; MANSANO, V. F.; TOZZI, A. M. G. A. Flora e distribuição geográfica da subfamília Mimosoideae (família Leguminosae) na diagonal de vegetações abertas da América do Sul. In: Congresso Nacional de Botânica, 64. Belo Horizonte, Minas Gerais, 10 a 15 de novembro de 2013. **Anais eletrônicos...** Belo Horizonte, MG, 2013.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, [S.l.], v. 4, p. 118-126, 2010.

LORENTE, M. G.; CARRETERO, C. L.; PÉREZ MARTÍN, A. P. Sensory attributes and antioxidant capacity of Spanish honeys. **Journal of Sensory Studies**, [S.l.], v. 23, p. 293–302, 2008.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 613, p. 1–19, 2008.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, United States of America, v. 79, p. 727–747, 2004.

MANTILLA, S. P. S. et al. Análise descritiva quantitativa aplicada em mel de abelhas (*Apis mellifera*): uma revisão. **Colloquium Agrariae**, [S.l.], v. 8, p. 75–84, 2012.

MANYI-LOH, C. E.; CLARKE, A. M.; NDIP, R. N. An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. **African Journal of Microbiology Research**, [S.l.], v. 5, p. 844–852, 2011.

MARCHINI, L. C.; REIS, V. D. A.; MORETI, A. C. C. C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p. 949–953, 2006.

MARENDIA, T. A. et al. Desenvolvimento de um sistema para classificação do mel em floral e melato por parâmetros físico químicos combinados com redes neurais artificiais. **Evidência**, Joaçaba, v. 11, p. 61–74, 2011.

MARIANO-DA-SILVA, F. M. S.; MARIANO-DA-SILVA, S.; COSTA-NETTO, A. P. Aplicação do índice de *Kirkwood* para diferenciar mel floral e de melato oriundos do município de Bom Retiro (SC). **Revista Agrarian Dourados**, Dourados, v. 4, p. 244–250, 2011.

MÁRQUEZ, L. et al. Use of a gastrointestinal model to assess potential amino acid bioavailability in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, [S.l.], v. 384–387, p. 46–55, 2013.

MARTÍNEZ, J. R.; ROSADO, C. I. **Atualización em nutrición 2005: evidencias em nutrición**. Madrid (Espanha): Sanitaria 200, 2005. 309p.

MARTINS, M., ORTH, A. I., NARDI, C. Interações entre *Apis mellifera* e as cochonilhas *tachardiella* sp. (homoptera: lacifferidae) em

bracatinga (*Mimosa scabrella* bentham - mimosaceae) em Bom Retiro, planalto catarinense. In: VI Congresso de Ecologia do Brasil. Fortaleza, Ceará, 9 a 14 de novembro de 2003. **Anais eletrônicos...** Fortaleza, CE, 2003.

MATHUMITHA, K. et al. Anti-oxidative and antagonistic activity of honey samples collected from different geographical areas of Tamilnadu. **Middle-East Journal of Scientific Research**, [S.l.], v. 21, p. 1377-1383, 2014.

MAURYA, S. et al. An overview on antioxidative potential of honey from different flora and geographical origins. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, [S.l.], v. 5, p. 9-19, 2014.

MAZUCHOWSKI, J. Z.; RECH, T. D.; TORESAN, L. **Bracatinga, *Mimosa scrabella* Bentham: cultivo, manejo e usos da espécie.** Florianópolis (SC): Epagri, 2014. 365p.

MEDA, A. et al. Physicochemical analyses of Burkina Fasan honey. **Acta Veterinaria Brno**, [S.l.], v. 74, p. 147-152, 2005.

MENDES, C. G. et al. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, p. 07-14, 2009.

MENDONÇA, K. et al. Plantas apícolas de importância para *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae) em fragmento de cerrado em Itirapina, SP. **Neotropical Entomology**, [S.l.], v. 37, p. 513-521, 2008.

MOREIRA, P. A. et al. Genetic diversity and mating system of bracatinga (*Mimosa scabrella*) in a re-emergent agroforestry system in southern Brazil. **Agroforestry Systems**, [S.l.], v. 83, p. 245–256, 2011.

MUNIZ, F. H.; BRITO, É. R. Levantamento da flora apícola do município de Itapecuru-Mirim, Maranhão. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 111-113, 2007.

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. **Science of the Total Environment**, [S.l.], v. 400, p. 115-141, 2008.

ORTH, A. I., MARTINS, M. Diversidade e abundância de insetos sobre as secreções de *tachardiella* sp. (Homoptera:Lacifferidae) em troncos de bracinga (*mimosa scabrella* bentham - Mimosaceae) no Planalto de Santa Catarina, Brasil. In: VI Congresso de Ecologia do Brasil. Fortaleza, Ceará, 9 a 14 de novembro de 2003. **Anais eletrônicos...** Fortaleza, CE, 2003.

O'SULLIVAN, A. M. et al. Comparison of the antioxidant activity of commercial honeys, before and after *in-vitro* digestion. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, [S.l.], v. 63, p. 167-171, 2013.

OTILIA, B. et al. Honeydew honey: correlations between chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial effect. **Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii**, [S.l.], v. 41, p. 271-277, 2008.

ÖZKÖK, A.; D'ARCY, B.; SORKUN, K. Total phenolic acid and total flavonoid content of turkish pine honeydew honey. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, [S.l.], v. 2, p. 65–71, 2010.

PEREIRA, F. M. et al. **Produção de mel: introdução e histórico**. EMBRAPA. 2003. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico2.htm>>. Acesso em: 9 out. 2015.

PÉREZ-PÉREZ, E.; VIT, P.; HUQ, F. Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity. **International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine**, [S.l.], v. 1, p. 063-072, 2013.

PÉREZ, R. A. et al. Amino acid composition and antioxidant capacity of spanish honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 55, p. 360-365, 2007.

PÉTRUS, K.; SCHWARTZ, H.; SONTANG, G. Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with Coulometric Electrode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.l.], v. 400, p. 2555–2563, 2011.

POHL, P. et al. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 134, p. 392-396, 2012a.

POHL, P. et al. Different aspects of the elemental analysis of honey by flame atomic absorption and emission spectrometry: a review. **Food Analytical Methods**, [S.l.], v. 5, p. 737-751, 2012b.

PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **Trends in Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 28, p. 893-902, 2009.

SALOMÉ, J. A.; ORTH, A. I. **A flora apícola catarinense e sua ação sobre as colmeias**. Disponível em:
<<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/71/artigo3.htm>>. Acesso em: 23 set. 2015.

SANTANA, C. M. et al. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. **Molecules**, [S.l.], v. 14, p. 298-320, 2009.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 101, p. 492–501, 2007.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 118, p. 391-397, 2010.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 130, p. 2073S–2085S, 2000.

SERGIEL, I; POHL, P. Determination of the total content of calcium and magnesium and their bioavailability in ripened bee honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 58, p. 7497-7501, 2010.

SERRANO, A. B. et al. Risk assessment of beauvericin, enniatins and fusaproliferin present in follow-up infant formula by *in vitro* evaluation of the duodenal and colonic bioaccessibility. **Food Control**, [S.l.], v. 42, p. 234-241, 2014.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, [S.l.], v. 52, p. 591–611, 1965.

SILICI, S.; SARIOGLU, K.; KARAMAN, K. Determination of polyphenols of some Turkish honeydew and nectar honeys using HPLC-DAD. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [S.l.], v. 36, p. 2330–2341, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. revisada. Florianópolis (SC): Ed da UFSC; Porto Alegre (RS): Ed. da UFRGS, 2001.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Society for Enology and Viticulture**, [S.l.], v. 16, p. 144–158, 1965.

SKOOG; D. A.; HOLLER; F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre (RS): Bookman, 2002.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical Methods**. 8. ed. Iowa: State University Press, 1989.

SOCHA, R. et al. Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. **International Journal of Food Science and Technology**, [S.l.], v. 46, p. 528–534, 2011.

SOMARRIBA, E.; KASS, D. Estimates of above-ground biomass and nutrient accumulation in *Mimosa scabrella* fallows in southern Brazil. **Agroforestry Systems**, [S.l.], v. 51, p. 77-84, 2001.

STEENBOCK, W. et al. Ocorrência da bracatinga (*mimosa scabrella* benth.) em bracatingais manejados e em florestas secundárias na região do planalto catarinense. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, p. 845-857, 2011.

SWIECA, M. et al. The influence of protein–flavonoid interactions on protein digestibility *in vitro* and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 141, p. 451-458, 2013.

TAGLIAZUCCHI, D. et al. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 120, p. 599–606, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre (RS): Artmed, 2009. 819p.

TOMÁS-BARBENÁN, F. A. et al. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.l.], v. 81, p. 485-496, 2001.

TRAUTVETTER, S.; KOELLING-SPEER, I.; SPEER, K. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. **Apidologie**, [S.l.], v. 40, p. 140–150, 2009.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, [S.l.], v. 2, p. 1231-1246, 2010.

TUBEROSO, C. I. G. et al. Biodiversity of *Salix* spp. honeydew and nectar honeys determined by RP-HPLC and evaluation of their antioxidant capacity. **Chemistry & Biodiversity**, [S.l.], v. 8, p. 872-879, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **The United States Pharmacopeia and The National Formulary**. USP 24-NF 19. Rockville (Estados Unidos): The United States Pharmacopeial Convention, 2000.

UTHURRY, C. A.; HEVIA, D.; GOMEZ-CORDOVES, C. Role of honey polyphenols in health. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, [S.l.], v. 3, p. 141-159, 2011.

VELA, L.; LORENZO, C.; PÉREZ, R. A. Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.l.], v. 87, p. 1069-1075, 2007.

VENTURIERI, G.; FERNANDES, M. **Plantas apícolas**. EMBRAPA Amazônia Oriental. Disponível em:
<<http://mel.cpatu.embrapa.br/plantas>>. Acesso em: 25 maio 2015.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 73, 2008.

WANG, S.-P.; FU, M.-D.; WANG, M.-H. Separation mechanism and determination of flavanones with capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 1164, p. 306–312, 2007.

WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, L. K.; LU, Y. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 70, p. 427–435, 2000.

WILCZYŃSKA, A. Phenolic content and antioxidant activity of different types of Polish honey – a short report. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences**, [S.l.], v. 60, p. 309–313, 2010.

WITTER, S. et al. Abelhas (Apidae) e cochonilhas (Stigmatococcidae), associadas à bracinga, para a produção de melato nos Campos de Cima Serra, RS, Brasil. In: IX Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto, São Paulo, 28 a 31 de julho de 2010. **Anais eletrônicos...** Ribeirão Preto, SP, 2010.

WOLFF, L. F. et al. Flora apícola arbórea nativa na região Serrana de Pelotas para a apicultura sustentável do Rio Grande do Sul. Documentos, 242. **Embrapa Clima Temperado**, [S.l.], 2008.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, [S.l.], v. 44, p. 217–224, 2011.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. **Journal of Functional Foods**, [S.l.], v. 3, p. 329–334, 2011.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of AOAC** - Association of Official Analytical Chemistry. Washington (DC): AOAC, 1975.